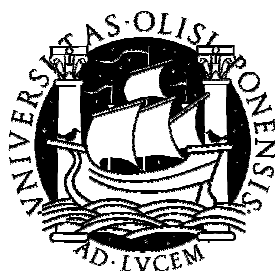


**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**“Estudo da susceptibilidade do VIH-2 à inibição por  
moléculas inibidoras do co-receptor CCR5”**

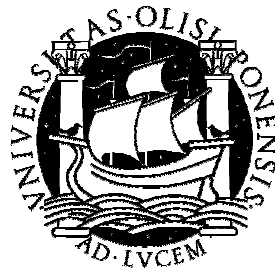
**Maria Espírito Santo**  
**Mestrado em Microbiologia Clínica**  
**2007/2008**

A impressão desta dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina de Lisboa em reunião de 15 /12/ 2009.

**Universidade de Lisboa**

**Universidade de Lisboa**

**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**“Estudo da susceptibilidade do VIH-2 à inibição por  
moléculas inibidoras do co-receptor CCR5”**

**Maria Espírito Santo**

**Mestrado em Microbiologia Clínica**

**Dissertação orientada pelo Professor Doutor José Miguel Azevedo  
Pereira**

Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade da sua autora, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados

*“Experiência não é o que nos acontece, mas o que fazemos com aquilo que nos acontece. ”*  
*Aldous Huxley*

## **Agradecimentos**

Os dois últimos anos foram, sem dúvida, importantes para a minha formação científica e pessoal. Tive o privilégio de cruzar-me com pessoas que me marcaram a vários níveis, e sem as quais não seria possível a concretização deste projecto. É para elas que vai o meu agradecimento:

Ao Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira pela sua orientação científica, pelo conhecimento que comigo partilhou ao longo da realização deste trabalho e pela sua disponibilidade.

Ao Professor Doutor José Moniz Pereira, por permitir desenvolver todo trabalho experimental na Unidade de Retrovírus e Infecções Associadas do Centro de Patogénese Molecular.

Um agradecimento muito especial a um colega pelo seu apoio incondicional, oportunas discussões durante o meu trabalho e por nunca me deixar perder a esperança que um dia eu iria chegar a este momento.

Às minhas colegas de mestrado, e acima de tudo amigas, Marta Simões e Paula Cerejo, por terem estado sempre presentes e pela vossa amizade.

À Marta Simões quero agradecer por todo o seu apoio e ajuda que me deu ao longo do trabalho. És a prova de que existe excelentes amigos. Muito, mesmo muito obrigada, por tudo.

À incansável Marta Calado, não só pela preciosa ajuda laboratorial, como pelo carinho com que desde logo me acolheu e pelas boas horas que passamos juntas.

À Manelita, pelo apoio incansável que me deu, pelas excelentes conversas que tivemos, pela amizade e generosidade sempre demonstrada. Obrigado por me deixares conhecer-te, pois és uma grande amiga.

À Lavinha pelo seu sorriso constante e pelas boas conversas que tivemos.

A todos os meus colegas do departamento de Virologia, Camila, Cheila, Inês, Marcelino, Pedro, e Quirina, por contribuírem para o bom ambiente do departamento, companheirismo e amizade.

D. Ofélia por todo o apoio logístico e pela sua simpatia, à D. Helena Brás e ao Sr. Augusto, por toda ajuda que me deram.

D. Fátima, pela sua maravilhosa boa disposição e também pela sua prontidão com que sempre me auxiliou durante o dia-a-dia de laboratório e por não deixar faltar nada.

As minhas irmãs e sobrinhas e a minha maravilhosa mãe que eu tanto amo, pela motivação, apoio, compreensão e sensatez com que sempre me ajudaram.

O meu maior agradecimento vai para duas pessoas formidáveis, mãe e Pedro, que me ajudaram imenso durante o meu mestrado e que me mostraram mais uma forma de vencer.

Dedico esta tese ao meu melhor amigo, confidente e marido Pedro Pascoal.

## Resumo

Até à data deste trabalho, poucos estudos têm sido feitos para determinar a susceptibilidade do VIH-2 aos antagonistas dos co-receptores (CoR). Estes pertencem a um grupo de inibidores de entrada com um novo mecanismo de acção, agindo fora da célula, ligam-se ao CoR, impedindo a sua utilização durante a entrada viral, ao contrário dos outros inibidores já existentes, que têm por alvo, proteínas do HIV.

Neste estudo, determinou-se a susceptibilidade do HIV-2 aos inibidores do CCR5 (TAK-779, MVC, PF-2221753 e mAb2D7) e do CXCR4 (SDF-1alpha e o mAb12G5), usando seis estirpes VIH-2 isoladas e caracterizados no nosso laboratório, e utilizando a estirpe HIV-1BaL como controlo. Para os ensaios de inibição, utilizou-se a linha celular humana obtida dum osteossarcoma (GHOST) que expressa o receptor CD4 e o co-receptor CCR5 ou CXCR4. A replicação viral foi monitorizada pela detecção do Ag p24 nos sobrenadantes da cultura.

Os resultados demonstraram que o TAK-779, MVC e o PF-222153 inibiram eficientemente todas as estirpes HIV-2 enquanto o mAb2D7, inibiu apenas a estirpe HIV-2<sub>ALI</sub>. Verificou-se ainda que o SDF-1alpha inibiu três das quatro estirpes estudadas, enquanto o mAb12G5 teve um efeito inibitório menor quando comparado com o SDF-1alpha.

Estes resultados permitem-nos concluir que: os antagonistas do CCR5 analisados são mais eficientes para o HIV-2 do que para o HIV-1<sub>BaL</sub> e que o SDF-1alpha é mais eficaz quando comparado com o mAb12G5 para a inibição das estirpes. Estes resultados sugerem assim novas direcções e soluções terapêuticas no combate à infecção por HIV-2.

Palavras-chave: VIH-2, co-receptores, antagonistas do CCR5, antagonistas do CXCR4.

## Abstract

Until the date of this work, little is known about HIV-2 susceptibility to coreceptor (CoR) antagonists (CCR5 and CXCR4 antagonists). These belong to a group of entry inhibitors with a novel mechanism of action, acting outside the cell by binding to CoR and preventing its use during viral entry, unlike the other existing drugs that target HIV proteins.

In this study we determine the susceptibility of HIV-2 to CCR5 (TAK-779, MVC, PF-2221753, mAb2D7) and CXCR4 (SDF-1alpha and mAb12G5) inhibitors using six strains previously isolated and characterized in our laboratory. HIV-1<sub>BaL</sub> was used as control. Inhibition assays, were done using human osteosarcoma cell line (GHOST) coexpressing CD4 and the CoR CCR5 or CXCR4 and viral replication was monitored by Ag p24 detection in culture supernatant.

The results indicated that TAK-779, MVC and PF-227153, efficiently inhibited all HIV-2 strains. Regarding mAb2D7, only inhibited the HIV-2<sub>ALI</sub> strain. It was also possible to demonstrate that SDF-1alpha inhibited three of the four strains studied, while mAb12G5 had lower inhibitory effect when compared to the SDF-1alpha.

These results enable us to conclude that the CCR5 antagonists under study are more efficient for HIV-2 than for HIV-1<sub>BaL</sub> and that SDF-1alpha is more effective when compared with mAb12G5 to the inhibition of these strains. Finally, these findings also suggest new directions and therapeutic solutions to the control of HIV-2 infection.

Keywords: HIV-2, coreceptor usage, CCR5 inhibitor, CXCR4 inhibitor



## Glossário de símbolos e abreviaturas

<b>μM</b>	Micromolar
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Agp24</b>	Antigénio p24
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>CA</b>	Proteína da cápside
<b>CCR5</b>	Receptor de quimiocina do tipo CC
<b>CMSP</b>	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
<b>CVEDT</b>	Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis
<b>CXCR4</b>	Receptor de quimiocina do tipo CXC
<b>DMEM</b>	Meio de Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco's Modified Eagle's Médium</i> )
<b>ECL</b>	Ansa extracelular ( <i>extracellular loop</i> )
<b>gp</b>	Glicoproteína
<b>h</b>	Hora
<b>HAART</b>	Terapêutica anti-retroviral de alta eficiência (Highly Active Antiretroviral Therapy)
<b>HR</b>	<i>Heptad Repeat</i>
<b>HTLV-III</b>	Vírus Linfotrópico Humano tipo III
<b>IC50</b>	Concentração necessária para inibir a replicação em 50%
<b>IN</b>	Integrase viral
<b>ITRN</b>	Inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleósdeos
<b>ITRNN</b>	Inibidores da transcriptase reversa não análogos dos nucleósdeos
<b>IP</b>	Inibidores da protease
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>l</b>	Litro
<b>LAV</b>	Vírus Associado a Linfadenopatia ( <i>Lymphadenopathy Associated Vírus</i> )
<b>LTR</b>	Repetição terminal longa ( <i>Long Terminal Repeat</i> )
<b>LTR3'</b>	Repetição terminal longa na extremidade 3'
<b>LTR5'</b>	Repetição terminal longa na extremidade 5'

<b>MA</b>	Proteína da matriz
<b>mg</b>	Miligramas
<b>MHC-I</b>	Complexo Major de Histocompatibilidade de classe I
<b>ml</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MVC</b>	Maraviroc
<b>NC</b>	Proteína da nucleocápside
<b>ng</b>	Nanograma
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>°C</b>	Graus Célsius
<b>pb</b>	Par(es) de bases
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacção de polimerização em cadeia ( <i>P</i> olymerase <i>C</i> hain <i>R</i> eaction)
<b>PR</b>	Protease viral
<b>R</b>	Região não codificante repetida situada nas extremidades do genoma do HIV ( <i>Repeated Sequence</i> )
<b>RT</b>	Transcriptase reversa viral ( <i>R</i> everse <i>T</i> ranscriptase)
<b>SIDA</b>	Síndrome da imunodeficiência adquirida
<b>SU</b>	Glicoproteína de superfície do invólucro viral
<b>TM</b>	Glicoproteína transmembranar viral
<b>U</b>	Unidade enzimática
<b>U3</b>	Região situada na extremidade 3' do genoma do HIV ( <i>U</i> nique <i>S</i> equences 3')
<b>U5</b>	Região não codificante situada próximo da extremidade 5' do genoma do HIV ( <i>U</i> nique <i>S</i> equences 5')
<b>VCV</b>	Vicriviroc
<b>VIH</b>	Vírus da imunodeficiência Humana
<b>VIH-2</b>	Vírus da imunodeficiência Humana tipo 2
<b>VIH-1</b>	Vírus da imunodeficiência Humana tipo 1
<b>VIS</b>	Vírus da Imunodeficiência Símia
<b>VIScpz</b>	Vírus da Imunodeficiência Símia dos chimpanzés <i>Pantroglodytes troglodytes</i>

---

<b>VISsm</b>	Vírus da Imunodeficiência Símia dos macacos <i>Cercocebus torquatus</i>
--------------	---

---

## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	III
Abstract .....	IV
Glossário de símbolos e abreviaturas .....	V
Índice de Figuras .....	X
Índice de Tabelas.....	XII
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1.Síndrome da Imunodeficiência Adquirida .....	1
1.2.Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo 2 .....	2
1.2.1.Origem.....	2
1.2.2.História natural da infecção e Patogenicidade .....	3
1.2.3.Organização genómica e estrutural .....	5
1.3.Epidemiologia VIH-2 .....	8
1.4.Transmissão do VIH-2 .....	9
1.5.Ciclo replicativo .....	10
1.5.1.O CD4 como receptor do VIH .....	12
1.5.2.Interacção com o Co-receptor .....	12
1.5.3.Mecanismo de fusão .....	16
1.6.Tropismo Celular.....	19
1.7.Utilização de co-receptores independentemente do CD4 .....	21
1.8.Terapêutica anti-retrovírica .....	22
1.8.1.Antagonista do CCR5 e o seu mecanismo de inibição.....	22

<b>2.</b>	<b>Objectivo .....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>Procedimento experimental.....</b>	<b>29</b>
	3.1.Cultura de células .....	29
	3.2.Extracção de ADN genómico a partir de sangue total periférico para PCR .....	30
	3.3.Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ no gene <i>ccr5</i> .....	30
	3.4.Vírus .....	32
	3.5. <i>Stock</i> Viral .....	32
	3.6.Ensaio de infecciosidade.....	33
	3.7.Ensaio de inibição.....	33
<b>4.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>35</b>
	4.1.Produção de <i>stocks</i> virais .....	35
	4.1.1.Determinação do fenótipo viral.....	36
	4.1.2.Análise da capacidade replicativa das estirpes .....	38
	4.2.Determinação da susceptibilidade de estirpes VIH-2 à inibição por inibidores do CCR5 .....	43
	4.3.Determinação da susceptibilidade de estirpes VIH-2 à inibição por inibidores do CXCR4 .....	46
<b>5.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>48</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão e Perspectivas .....</b>	<b>55</b>
	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>57</b>

## Índice de Figuras

### Introdução

Figura 1: Diagrama esquemático do decurso da infecção viral .....	3
Figura 2: Esquema representativo de um virião maduro de VIH-2. ....	6
Figura 3: Organização genómica do VIH-2 .....	6
Figura 4: Estrutura do CCR5. ....	14
Figura 5: Interação da glicopreína de SU com o co-receptor.....	14
Figura 6: Corte transversal da hélice sextupla. . ....	17
Figura 7: Esquema do processo de fusão. ....	18
Figura 8: Tropismo celular do VIH.....	19
Figura 9: Modelo do mecanismo de acção de pequenas moléculas inibidoras do CCR5.....	24
Figura 10: Aminoácidos envolvidos na interacção do mAb 2D7, TAK-779 e MVC com co-receptor CCR5. ....	26

### Resultados

Figura 11- Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ gene ccr5 .....	36
Figura 12 – Análise da capacidade replicativa do HIV-2 <sub>MS</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4. ....	39
Figura 13 – Análise da capacidade replicativa do HIV-2 <sub>MMS</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4. ....	40
Figura 14 – Análise da capacidade replicativa do HIV-2 <sub>ADC.05</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4. ....	40
Figura 15– Análise da capacidade replicativa do HIV-2 <sub>ALI</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4. ....	41

Figura 16 – Análise da capacidade replicativa do HIV-2 <sub>ABG.01</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4. ....	41
Figura 17 – Análise da capacidade replicativa do HIV-2 <sub>SAB</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4. ....	42

## Índice de Tabelas

### Procedimento experimental

Tabela 1 – <i>Primers</i> utilizados nas reacções de amplificação por PCR .....	30
Tabela 2 – Mistura de reacção e parâmetros das reacções de PCR.....	31
Tabela 3 – Parâmetros das reacções de PCR.....	31

### Resultados

Tabela 4 – Caracterização das estirpes VIH-2, utilizando células GHOST que expressam CD4 e CCR5 ou CXCR4 e as CMPS. ....	38
Tabela 5 - Valores da transcriptase reversa (RT) do <i>stock</i> viral .....	39
Tabela 6 – Taxa de inibição para estirpes VIH-2 e HIV-1 <sub>BaL</sub> .....	44
Tabela 7 – Taxa de inibição para o nono dia em estirpes VIH-2 com tropismo duplo.....	46



# 1. Introdução

## 1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

O vírus da imunodeficiência humana (VIH) é o agente etiológico da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), representando actualmente um dos principais problemas de Saúde Pública a nível mundial.

A SIDA foi diagnosticada pela primeira vez em 1981<sup>19</sup> quando um padrão comum de sintomas foi observado entre um pequeno número de homossexuais do sexo masculino nos Estados Unidos da América.<sup>54</sup>

No início de 2008, 27 anos depois do reconhecimento da SIDA, cerca de 33 milhões de pessoas encontravam-se infectadas pelo VIH e mais de 35 milhões já morreram desde o início da epidemia.<sup>66</sup>

O agente etiológico responsável pela SIDA consiste em dois tipos de VIH, 1 (VIH-1)<sup>10</sup> e o 2 (VIH-2),<sup>28, 29</sup> que se distinguem pelas suas propriedades antigenicas, moleculares e biológicas.

O VIH-1 é o vírus responsável pela pandemia global, enquanto o VIH-2 se encontra praticamente restrito a alguns países da África Ocidental, onde é endémico.<sup>143</sup> Este último é ainda responsável por um número reduzido de casos na Europa e noutros continentes, que ocorrem, sobretudo, em indivíduos oriundos da África Ocidental ou com ligações a esta região.<sup>114, 140</sup>

## **1.2. Vírus da Imunodeficiência Humana do Tipo 2**

### **1.2.1. Origem**

O VIH foi isolado pela primeira vez em 1983 por um grupo liderado pelo investigador Luc Montaigner, em França, sendo denominado de LAV (*Lymphadenopathy Associated Virus*-Vírus Associado a Linfadenopatia).<sup>10, 49, 97</sup>

Em 1986, um comité internacional de taxionomia vírica recomendou o termo VIH (*Human Immunodeficiency Virus* - Vírus da Imunodeficiência Humana) para denominar esse vírus. Também nesse ano, através de uma colaboração entre clínicos, virologistas portugueses e investigadores franceses, foi isolado pela primeira vez o VIH-2, a partir de doentes sintomáticos provenientes da Guiné-Bissau, internados na Unidade de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Egas Moniz com uma imunodeficiência semelhante aos indivíduos com VIH-1.<sup>28,29,30</sup>

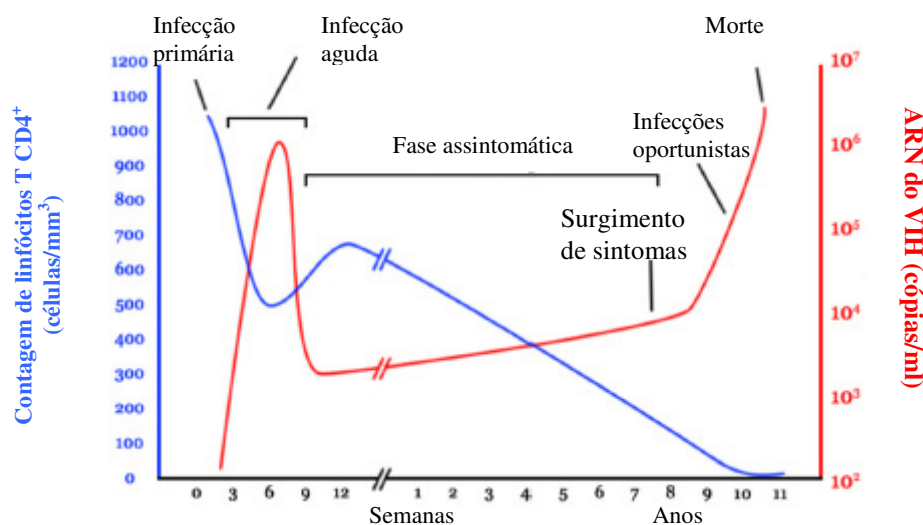
Embora não se saiba ao certo qual a origem do VIH-1 e do VIH-2, estudos filogenéticos demonstraram que a ancestralidade do VIH se situa no Vírus da Imunodeficiência Símia (VIS), tendo a sua passagem para o Homem ocorrido entre as décadas 30 e 40 do século passado. Assim, pressupõe-se que o VIH teve origem em transmissões zoonóticas de primatas não humanos infectados com o VIS.<sup>50,55, 130, 158</sup>

A transmissão do VIS dos chimpanzés *Pantroglodytes troglodytes* (VIScpz) parece ter originado o VIH-1, enquanto a transmissão do VIS dos macacos *Cercocebus torgnatos atys* (VISsm) poderá estar na origem do VIH-2.<sup>50, 77, 82</sup>

Até à data foram descritos oito grupos filogenéticos do VIH-2 que se acredita representarem oito eventos distintos de transmissão dos vírus dos macacos para os humanos.<sup>38, 130</sup>

### 1.2.2. História natural da infecção e patogenicidade

Na ausência de terapêutica anti-retrovirica, a história natural da infecção pelo VIH caracteriza-se por quatro fases: infecção aguda, fase assintomática, também conhecida como latência clínica, fase sintomática inicial ou precoce e SIDA.



**Figura 1:** Diagrama esquemático do decurso da infecção viral (Adaptado de Fauci *et al*, 1996)

O período de infecção aguda, ocorre até quatro semanas após a exposição ao vírus. Nesta fase o indivíduo é por vezes afectado por diversos sintomas pouco característicos, semelhantes aos de uma gripe.<sup>145</sup> Esta fase caracteriza-se por elevados níveis de replicação do VIH-1, virémia elevada e um decréscimo dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>. Durante o pico de virémia, ocorre diminuição rápida dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que posteriormente voltam a aumentar sem no entanto atingir os níveis existentes antes da infecção (Figura 1). Após esta fase, atinge-se um ponto de equilíbrio entre a replicação viral e a resposta imunológica do hospedeiro, caracterizada por valores de carga viral baixos e valores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> estabilizados.<sup>85</sup> Esta queda do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> está directamente relacionada com a velocidade da replicação viral e à progressão para a SIDA.

A fase assintomática, caracteriza-se por baixos títulos virais, ausência de sinais clínicos e forte resposta imunológica. Pode prolongar-se, em média, por oito a dez anos no caso do VIH-1, sendo este período geralmente mais alargado para o VIH-2, (dez ou mais anos)<sup>98, 119</sup> resultando num índice de mortalidade cerca de dois terços inferior ao VIH-1, podendo nunca chegar a progredir para SIDA.<sup>4, 92, 98, 119, 154</sup> A carga proviral nas células mononucleadas do sangue periférico (CMSPs) é semelhante nos indivíduos infectados por ambos os vírus, no entanto, a carga viral plasmática na infecção pelo VIH-2 é mais baixa, principalmente nos indivíduos assintomáticos.<sup>5, 13, 52, 117, 141</sup> Estes baixos valores de carga viral plasmática estão frequentemente associados a uma maior dificuldade no isolamento do VIH-2 *in vitro*, comparativamente ao VIH-1<sup>52, 118, 139</sup> e a uma baixa replicação do VIH-2.<sup>4, 14, 60</sup>

Após a fase assintomática ocorre a fase sintomática que é caracterizada por um aumento da replicação viral e da destruição de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e consequente debilitação do sistema imunitário, com sintomas e sinais clínicos associados.<sup>65</sup> Nesta fase o desenvolvimento da doença é semelhante para ambos os vírus.

Quando a contagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é inferior a 200 células/mm<sup>3</sup>, o risco de infecção por agentes oportunistas e outras complicações clínicas associadas é elevado.

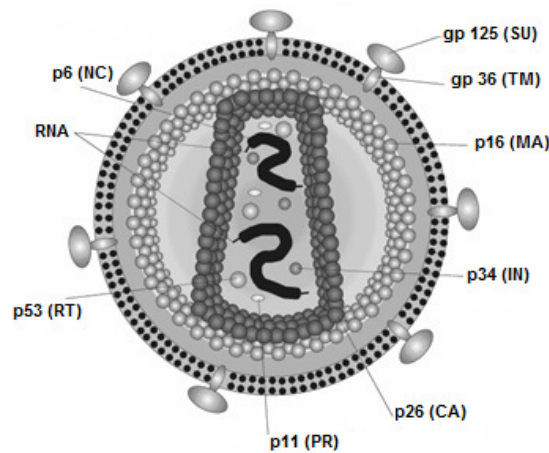
Consequentemente, há um aumento dos níveis de virémia e uma progressiva destruição do sistema imunológico do hospedeiro, levando à última fase, a SIDA (que conduz à morte).<sup>80, 134</sup>

### 1.2.3. Organização genómica e estrutural

O VHI-2, tal como o VHI-1 e o VIS, pertencem ao género *Lentivirus*, subfamília *Orthoretrovirinae* e família *Retroviridae*.<sup>63</sup>

As partículas virais do VIH-2 apresentam uma estrutura esférica com cerca de 110 nm de diâmetro e encontram-se revestidas por um invólucro fosfolipídico, derivado da membrana celular da célula hospedeira.<sup>32, 48</sup> Neste invólucro encontram-se inseridas a glicoproteína (gp) de superfície (SU) com 125KDa (gp125) e a glicoproteína transmembranar (TM) com 36KDa (gp36), derivadas da glicoproteína precursora (gp140).<sup>32, 48, 91</sup> Internamente, este invólucro, é revestido por uma camada constituída pela proteína da matriz (MA/p16), que se encontra localizada entre a nucleocápside e o invólucro viral.

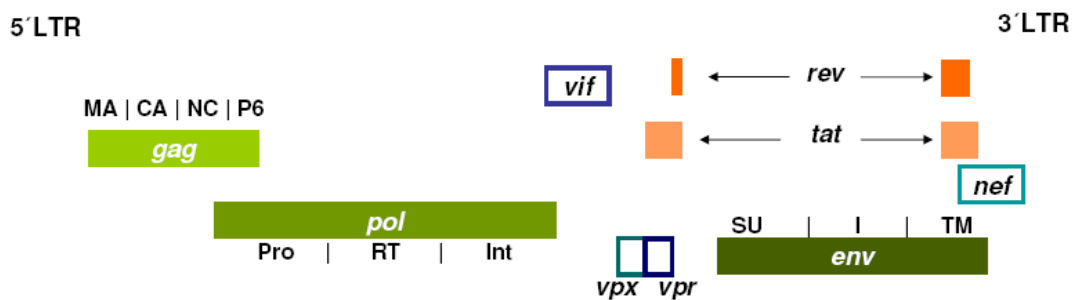
A cápside viral, é composta pela proteína p26 (CA) e possui no seu interior duas cópias idênticas de moléculas de ácido ribonucleico (ARN) com cerca de 9200 pares de bases (pb), associadas às proteínas da nucleocápside. Contem ainda as enzimas necessárias à replicação viral: a retrotranscriptase (RT/p53), a protease (PR/p11), e a integrase (IN/p34), e as proteínas Nef, Vif, Vpr e Vpx.<sup>32, 48, 60, 132</sup>



**Figura 2:** Esquema representativo de um virião maduro de VIH-2 (adaptado de <http://en.wikipedia.org/wiki/HIV>).

A organização genómica do VIH-2 é semelhante à do VIH-1 e à do VIS<sub>sm</sub>. A principal diferença reside no facto do VIH-2 possuir o gene *vpx* em vez do gene *vpu* (presente no VIH-1). A organização molecular e a homologia genética do VIH-2 tornam este vírus mais próximo do VIS<sub>sm</sub> do que do VIH-1. Apresentando uma homologia de 40% com o VIH-1 e de 75 a 80% com o VIS<sub>sm</sub>.<sup>10, 24, 28, 130, 132</sup>

A organização do genoma deste vírus inclui duas regiões terminais não codificantes e uma região central codificante. Nesta última região, para além dos três genes estruturais (*gag*, *pol* e *env*) comuns a todos os retrovírus, o HIV contém mais seis genes que codificam para duas proteínas reguladoras Tat e Rev e quatro proteínas acessórias (Nef, Vif, Vpr e Vpx), fazendo um total de nove genes.<sup>32, 83, 123, 132</sup>



**Figura 3:** Organização genómica do VIH-2 (Retirado de Santos-Costa *et al*, 2007)

As proteínas reguladoras Tat e Rev, são essenciais para a replicação viral, actuando na activação da transcrição e na regulação da expressão do ARN mensageiro. As quatro proteínas restantes: Nef, Vif, Vpr e Vpx, não são essenciais para a replicação viral na maioria das linhas celulares T, sendo por isso designadas de proteínas acessórias; mas modelam a replicação viral e são essenciais para uma produção viral eficiente *in vivo*.<sup>48,</sup>

132

A proteína Nef contribui para a patogénese do VIH, uma vez que promove a infecção viral através da activação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> tornando-os mais susceptíveis à infecção. Em contrapartida, a Nef afecta as vias de transdução de sinal e reduz a expressão do receptor CD4, facilitando a gemulação e libertação das partículas virais. A Nef tem ainda a capacidade de proteger as células infectadas dos linfócitos T citotóxicos através da redução da expressão do Complexo Major de Histocompatibilidade de classe I (MHC-I), o qual é necessário para o reconhecimento destes linfócitos.<sup>128, 132</sup>

A proteína Vif aumenta a infecciosidade viral diminuindo a incorporação da proteína celular APOBEC3G, a qual funciona como inibidor da replicação do VIH-1.<sup>53, 126</sup> Enquanto as proteínas Vpr e a Vpx aumentam a eficácia da replicação viral.<sup>57, 70, 89, 111</sup>

Os genes *gag* e *pol* codificam para uma poliproteína precursora de 160 kDa (Pr160 ou Gag-Pol) que quando processada pela protease viral origina sete proteínas.<sup>32, 60, 83</sup> Sendo quatro dessas codificadas pelo gene *gag*: a da matriz MA (p16), da cápside CA (p26), da nucleocápside NC (p6) e a proteína C-terminal (p6).

As três proteínas codificadas pelo gene *pol* são essenciais para replicação viral, sendo elas: a protease (PR /p11), a transcriptase reversa (RT/p53) e a integrase (IN/p34).

A PR é responsável pelo processamento da poliproteína Gag-Pol durante a fase de maturação do virão, a RT converte o ARN genómico viral em ácido desoxirribonucleico (ADN) proviral e a IN encontra-se envolvida no mecanismo de integração do ADN proviral no genoma da célula hospedeira.<sup>32, 60, 83</sup>

O gene *env* codifica para a poliproteína precursora gp140, que é clivada por uma protease celular, originando as glicoproteínas do invólucro gp125 (SU) e gp 36 (TM).<sup>119, 125</sup> A gp125 possui os domínios específicos de ligação aos receptores presentes na membrana da célula hospedeira, enquanto a gp36 tem um papel determinante na fusão do vírus à membrana celular e na ligação do invólucro à proteína de matriz MA, necessária para a formação de novos viriões. Ambas as glicoproteínas são altamente antigénicas, ou seja, suscitam a produção de anticorpos nos hospedeiros infectados.<sup>32, 60, 83</sup>

As regiões não codificantes estão localizadas nas extremidades do genoma (R e U5 em 5' e R e U3 em 3') do VIH-2. Durante a transcrição reversa, são duplicadas de modo a formar a estrutura do LTR (*long terminal repeat*). Esta estrutura (LTR) tem um papel importante não só na integração do genoma do VIH, como também na regulação da expressão do mesmo.<sup>32, 60, 83</sup>

### 1.3.Epidemiologia do VIH-2

A infecção pelo VIH-2 ocorre principalmente em alguns países da África Ocidental, nomeadamente na Guiné-Bissau, Senegal, Gâmbia, Burkina Faso, Gana, Costa do Marfim, Nigéria e Cabo Verde, onde se julga estar presente desde a década quarenta do século passado.<sup>82, 89, 123</sup>



Na Europa, a infecção por VIH-2 permanece relativamente rara,<sup>99, 114</sup> sendo a maioria dos casos encontrados em Portugal e França,<sup>37, 51, 69</sup> devido às ligações históricas e socio-económicas com as populações dos países africanos referidos anteriormente.<sup>68, 114,</sup>

125

Em Portugal, os casos notificados de SIDA devidos à infecção por VIH-2 são 485 num total de 15020, o que corresponde a 3,2% do total de casos notificados de SIDA, existindo ainda nesse total, 189 casos que referem infecção associada aos vírus VIH-1 e VIH-2, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis (CVEDT) de 31 de Dezembro de 2008.<sup>35</sup>

Actualmente encontram-se descritos oito grupos filogenéticos do VIH-2<sup>38, 123, 130, 158</sup> que podem ser classificados em grupos epidémicos (A e B) e não epidémicos (C-H).<sup>38,</sup>

68, 123, 130, 158

#### **1.4. Transmissão do VIH-2**

O VIH-2 apresenta as mesmas vias de transmissão que o VIH-1, sendo a transmissão pela via heterossexual a dominante.<sup>99</sup> No entanto, a frequência de transmissão do VIH-2 é cerca de cinco a nove vezes inferior à do VIH-1.<sup>107, 123</sup>

Uma das razões para a reduzida taxa de transmissão e menor patogenicidade parece dever-se à fraca capacidade replicativa do VIH-2 *in vivo*, atingindo baixos valores de carga viral comprometendo portanto a transmissão do vírus e a progressão da infecção.<sup>14,16, 107</sup>

Em Portugal, até ao final de 2007, 70% dos casos notificados de infecção VIH/SIDA pelo VIH-2, correspondiam a transmissão por via heterossexual, sendo a segunda causa mais frequente (13%) correspondente a possível transmissão do vírus por transfusões sanguíneas.<sup>35</sup>

Na infecção pelo VIH-2, a transmissão vertical tem uma taxa ocorrência cerca de 10 a 20 vezes inferior à do VIH-1,<sup>107, 123</sup> alguns autores sugerem como causa para este facto os baixos níveis de ARN viral na mãe.<sup>82, 107</sup>

Alguns estudos mostram evidências de que o índice de sobrevivência dos adultos infectados com VIH-2 é superior ao dos infectados com VIH-1.<sup>92, 118, 144</sup> Isto parece dever-se a características particulares do próprio vírus e a factores do hospedeiro no decurso da infecção.<sup>98</sup> Como por exemplo: a resposta imunitária contra o VIH-2 é mais eficiente comparativamente com a do VIH-1, o que pode explicar a baixa progressão para a doença em indivíduos infectados pelo VIH-2.<sup>8, 14, 16, 21, 140</sup>

## 1.5.Ciclo replicativo

De acordo com o modelo actualmente aceite, o primeiro passo da infecção pelo VIH é a ligação das partículas virais a receptores específicos na membrana da célula alvo.<sup>27, 32,</sup>

<sup>60</sup> O principal receptor do VIH é a molécula CD4, presente na superfície das células T auxiliaadoras e em células das linhas macrofágicas e monocíticas.<sup>1, 27, 32, 39, 60, 147</sup>

A interacção do vírus com a membrana celular processa-se através de uma primeira ligação da glicoproteína SU ao receptor CD4. Esta ligação induz alterações conformacionais na glicoproteína, expondo ou formando o domínio de ligação ao co-receptor.<sup>39, 48</sup>

A interacção do complexo glicoproteína SU/CD4 ao co-receptor induz um rearranjo na glicoproteína TM, que resulta na inserção de um péptido de fusão na membrana celular e na ligação das regiões HR1 e HR2, permitindo que esta promova a fusão do invólucro com a membrana celular e consequente entrada da nucleocápside viral para o interior da célula.<sup>39,48, 96</sup>

Após a entrada da cápside na célula e a sua descapsidação no citoplasma, a RT promove a transcrição reversa do ARN genómico viral em ADN de cadeia dupla, originando o complexo de pré-integração.<sup>48, 54</sup> Este complexo é transportado para o núcleo, através de um mecanismo mediado pelas proteínas Vpr, IN e MA.<sup>54</sup> Uma vez no núcleo e por acção da enzima IN, ocorre a integração do ADN proviral no genoma da célula hospedeira.

O ADN proviral integrado (provírus) recorre à maquinaria transcripcional celular para a produção das primeiras cópias de ARN viral.<sup>48, 54</sup> A transcrição inicial resulta na síntese precoce de proteínas reguladoras como a Tat e a Rev. A Tat liga-se ao TAR (elemento de resposta à transativação) na terminação 5' do ARN viral, estimulando a formação de transcritos de ARN longos.<sup>47, 121</sup> A Rev actua como regulador pós-transcripcional viral e facilita a exportação nuclear de ARN viral do núcleo e a sua tradução em polissomas citoplasmáticos. Uma parte dos transcriptos virais completos interage com os polipéptidos precursores do virião, Gag e GagPol, para produzir nucleocápsides imaturas junto da membrana citoplasmática. Estas nucleocápsides adquirem posteriormente o invólucro por gemulação, nas regiões da membrana plasmática que contêm as proteínas Env. As novas partículas são libertadas para o espaço extracelular e as poliproteínas Gag e GagPol são processadas proteoliticamente pela protease viral PR formando viriões infecciosos.<sup>32, 48</sup>

### 1.5.1. O CD4 como receptor do VIH

A entrada do VIH na célula é iniciada pela ligação da glicoproteína SU ao receptor CD4 presente na superfície da membrana celular. A glicoproteína SU contém cinco regiões conservadas (C1-C5) e cinco regiões variáveis (V1-V5). Estas últimas regiões tendem a formar estruturas em ansa, estabilizadas por pontes de dissulfureto, e as regiões conservadas formam estruturas descontínuas, importantes na interacção com o ectodomínio da subunidade transmembranar e com o receptor viral na célula alvo.<sup>123, 128</sup> Esta glicoproteína é formada por um domínio interno e outro externo ligados por um terceiro denominado *bridging sheet*, onde se encontram as regiões V1/V2 e V3 expostas à superfície.<sup>76, 79</sup>

Em 1984 foi reconhecida a susceptibilidade das células T CD4<sup>+</sup> à infecção pelo VIH-1 pelos grupos de investigação de Dalglish e Klatzmann independentemente.<sup>36, 74, 151</sup> A ligação do receptor CD4 (carga negativa) com a glicoproteína SU (carga positiva) é realizada por forças electrostáticas, a qual é estabilizada por forças de Van der Waals e por pontes de hidrogénio.<sup>20</sup>

A interacção entre o receptor CD4 e a glicoproteína SU, provoca alterações na conformação desta glicoproteína, nomeadamente nas regiões V1, V2, V3 e C4 da folha- $\beta$ , que levam à exposição ou formação do local de ligação ao co-receptor.<sup>127,142,150, 156</sup>

### 1.5.2. Interacção com o Co-receptor

Uma década depois de se ter descoberto o CD4, como o receptor com maior afinidade para a glicoproteína SU, foi identificado um segundo grupo de receptores fundamentais ao processo de entrada do VIH na célula – os receptores de quimiocinas.<sup>42, 43, 144</sup>

Actualmente conhecem-se vinte e um receptores de quimiocinas que funcionam como co-receptores para o VIH-1 e VIH-2 *in vitro* (CCR1, CCR2b, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9B, CCR10, CCR11, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CX3CR1, XCR1, D6, DARC).<sup>6, 8, 136, 155</sup> Apesar de existirem vários co-receptores descritos na literatura, o CCR5 parece ser de primordial importância na patogénese da infecção pelo VIH, tendo isso já sido comprovado por vários estudos. Por exemplo, a maioria dos indivíduos homozigóticos para uma deleção no gene *ccr5* (delta 32 *ccr5*) são resistentes à infecção pelo VIH-1.<sup>12, 129</sup> Os indivíduos que são heterozigóticos para esta deleção mostraram ter uma expressão diminuída do CCR5 na membrana celular e estas deleções são frequentemente encontradas nos indivíduos que têm uma lenta progressão para a doença.<sup>58, 87</sup>

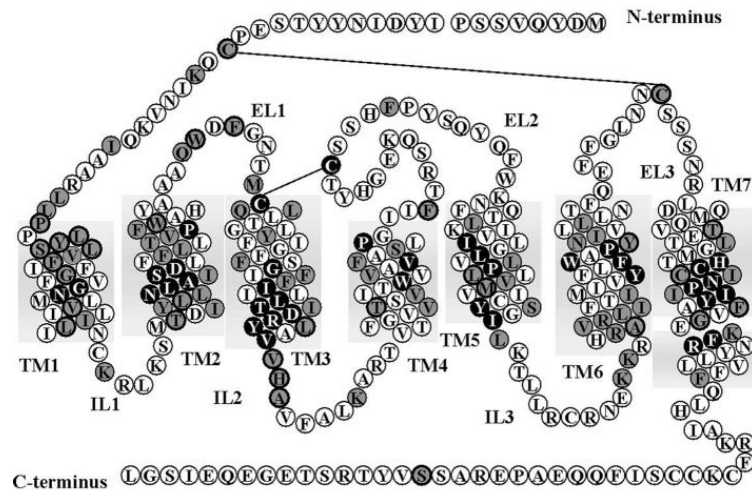
Os principais co-receptores utilizados pelo VIH *in vivo* são o CCR5 e o CXCR4.<sup>8, 137, 155</sup> Pertencem à família dos receptores das quimiocinas e são constituídos por sete regiões transmembranares (7TM) que estão ligadas intracelularmente à proteína G (Figura 4).<sup>17,</sup>

113

As proteínas G são importantes moléculas transmissoras de sinais. As suas ansas extracelulares ligam-se às quimiocinas enquanto as ansas intracelulares são responsáveis pela sinalização e respectiva resposta celular.<sup>95, 104</sup>

Os co-receptores estão topologicamente organizados numa região N-terminal, três ansas extracelulares, três ansas intracelulares e uma região C-terminal (Figura 4).<sup>62, 113</sup>

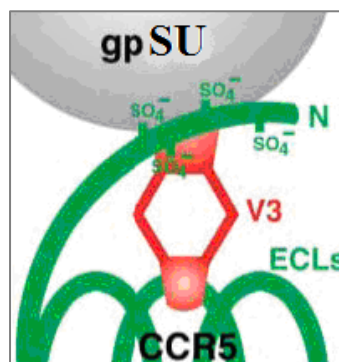
O CCR5 possui quatro cisteínas nas regiões extracelulares ligadas por ligações bissulfito, uma entre a região N-terminal e a terceira ansa e a outra entre a segunda e a terceira ansa, sendo estas ligações responsáveis pela sua estrutura tridimensional (Figura 4).<sup>62, 101, 113</sup>



**Figura 4:** Estrutura do CCR5. Os rectângulos cinzentos representam sete regiões transmembranares, TM1 ao TM7 e 8 hélices. EL e IL são regiões loop externas e internas. Ligações bissulfito entre as cisteínas, C20-C269 e C101-C178. (Adaptado de Paterlini *et al*, 2002)

Cada uma das regiões extracelulares tem sido implicada na função dos co-receptores do VIH, tendo sido sugerido por vários autores que o segmento N-terminal é de particular importância.<sup>11, 61, 110</sup>

As regiões do co-receptor envolvidas na interacção com a glicoproteína SU são, em primeiro lugar, a extremidade N-terminal (que se liga à região central da SU e à base da ansa da V3) e, em seguida, a segunda ansa extracelular (que se liga à extremidade da V3).<sup>61, 123, 141</sup>



**Figura 5:** Interacção da glicopreína de SU com o co-receptor. A verde está representado o CCR5 com a região N-terminal e três ansas extracelulares e a vermelho a região V3 que se vai ligar aos sulfatos da região N-terminal (Adaptado de Huang *et al*, 2005).

Através da região V3, o complexo glicoproteína SU-CD4 liga-se ao co-receptor, ficando mais próximo da membrana celular. Vários estudos no VIH-1, indicam que alterações das sequências de aminoácidos da terceira região variável da SU podem determinar uma alteração no tropismo celular. De facto, um aumento de carga nesta região, por alterações de um ou dois aminoácidos na posição 11 e/ou 25 na VHI-1, ou nas posições 18 ou 19 e 27 no VIH-2, parecem ser suficientes para que ocorra uma alteração do fenótipo de R5 para X4.<sup>34, 64, 84, 135,157</sup>

Os locais de glicosilação na região V3 também têm sido indicados como um factor importante no uso do CCR5 ou do CXCR4 na infecção pelo VIH-1.<sup>31, 116</sup> No caso da infecção pelo VIH-2, a sua influência no uso de co-receptores não está ainda estabelecida.<sup>135</sup>

No entanto, outras regiões como a V1/V2 e a C4 podem também estar envolvidas na interacção do complexo glicoproteína SU-CD4 ao co-receptor.<sup>11, 34,150</sup>

As regiões variáveis V1/V2 e V3 da glicoproteína SU afectam o tropismo celular,<sup>12,76</sup> sendo este determinado pelo uso dos co-receptores CCR5 e/ou CXCR4, classificando-se os vírus por R5, X4 e R5/X4.<sup>11, 12, 76</sup>

As mutações na região V1/V2 parecem compensar directa ou indirectamente as mutações da V3, sendo estas necessárias para que ocorra a troca de utilização dos co-receptores. No entanto, estas são insuficientes para produzir os intermediários infecciosos necessários para que ocorra a alteração no uso de co-receptores (do CCR5 para o CXCR4) durante a evolução da infecção.<sup>112</sup>

Para as estirpes de VIH-2, persistem ainda algumas dúvidas relativamente a quais os aminoácidos que poderão ser determinantes na alteração do tropismo viral.<sup>64, 135</sup>

Um estudo realizado por Shi e colaboradores verificou que as posições determinantes na região V3 para a transição de utilização de CCR5 para CXCR4 são a 19 e a 27.<sup>135</sup> No entanto, a ausência de variabilidade significativa nesta região parece estar relacionada com uma gama mais alargada de utilização dos co-receptores. Este facto sugere que outras regiões variáveis, tais como a V1/V2 possam influenciar directamente a ligação ao co-receptor.

A utilização de co-receptores depende também do grau de glicosilação da região V3.<sup>31,</sup>

<sup>87</sup> Um estudo, realizado em 2006, por Clevestig e colaboradores demonstrou que na infecção pelo VIH-1, a ausência de um local de glicosilação na região V3, associada a uma forte carga positiva nessa região, tem um papel relevante na alteração dos vírus R5 para X4.<sup>31</sup>

Um outro estudo, realizado em 2005, verificou que o grau de glicosilação do VIH-2 é inferior ao do VIH-1, embora ainda não se encontre estabelecida a sua influência na determinação do uso dos co-receptores.<sup>135</sup>

### **1.5.3. Mecanismo de fusão**

Em consequência da interacção entre a glicoproteína SU com o CD4 e os co-receptores ocorre uma alteração conformacional da glicoproteína transmembranar (TM) que provoca uma mudança do estado não fusogénico para fusogénico que, por sua vez, conduz ao processo de fusão do invólucro viral com a membrana celular.<sup>88, 131</sup>

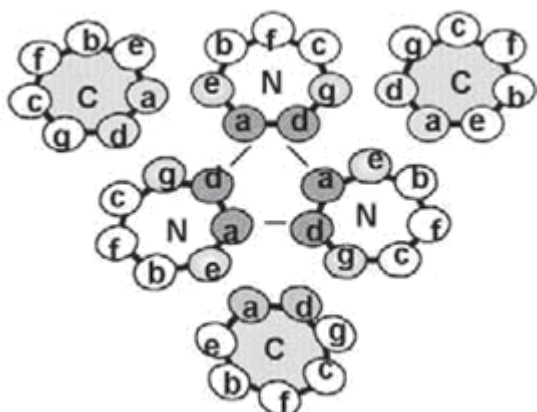
Na partícula viral a glicoproteína TM é formada por uma estrutura trimérica constituída por três oligómeros,<sup>33</sup> em que cada um se liga por ligações não-covalentes à glicoproteína SU. Cada glicoproteína TM possui três regiões: uma região intracitoplasmática (endodomínio), uma região transmembranar e uma região extracelular (ectodomínio).<sup>20</sup>



Com o conhecimento da estrutura molecular do ectodomínio da TM foi possível identificar locais da molécula susceptíveis de serem utilizados como alvos para novos fármacos anti-VIH, desenvolvidos com base na estrutura do local de interacção das regiões da TM com a membrana celular.<sup>25, 33</sup>

O ectodomínio da TM é uma região hidrofóbica rica em glicinas na extremidade N-terminal, constituído por um péptido de fusão e por regiões *leucine-zipper*, também denominadas *heptad repeat* (HR1 e HR2).<sup>119</sup>

As regiões HR têm características de padrões repetidos de sete resíduos (a,b,c,d,e,f,g) sendo as posições “a” e “d” da hélice N (região HR1) (Figura 6) ocupadas por aminoácidos hidrofóbicos,<sup>119</sup> especialmente importantes para a estabilização trimérica; enquanto que os resíduos “e” e “g” interagem com os resíduos “a” e “d” da hélices C (região HR2).<sup>119, 150</sup>

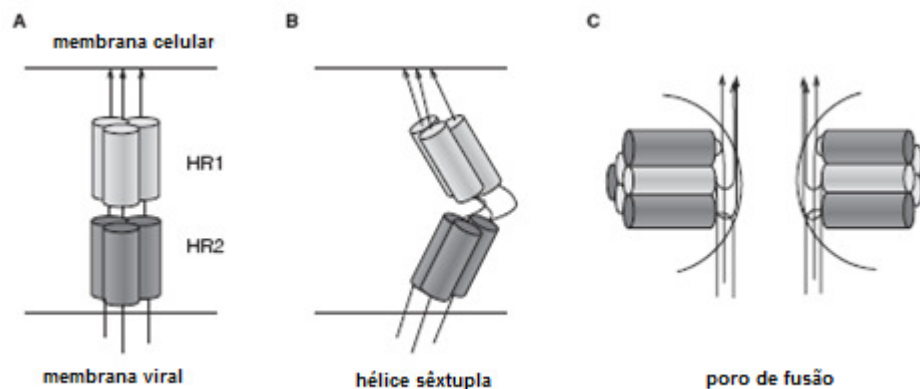


**Figura 6:** Corte transversal da hélice sextupla. As posições “a” e “d” nas hélice-N são importantes para estabilização trimérica, coiled coil core, enquanto os resíduos “e” e “g” interagem com os resíduos “a” e “d” da hélice-C. (Adaptado de Weiss *et al*, 2003).

Entre as regiões HR1 e HR2 existe uma ansa constituída por cinco aminoácidos hidrofóbicos definida por dois resíduos de cisteína (CC) (Figura 6).<sup>73, 119</sup>

Na fase de pré-ativação (antes da ligação ao co-receptor), o péptido de fusão encontra-se dentro da estrutura trimérica. O trímero interno da estrutura da HR1 e o trímero externo da HR2 formam uma estrutura super-enrolada em hélice sêxtupla. As regiões HR2 dobram-se de forma a ficarem antiparalelas às regiões HR1 através da existência dos cinco aminoácidos hidrofóbicos existentes entre elas (Figura 7).<sup>119</sup>

A mudança de energia libertada durante a formação da hélice sêxtupla fornece a energia necessária para a formação do poro de fusão, através do qual ocorre a entrada do conteúdo da cápside viral no citoplasma da célula alvo.<sup>96, 119</sup>

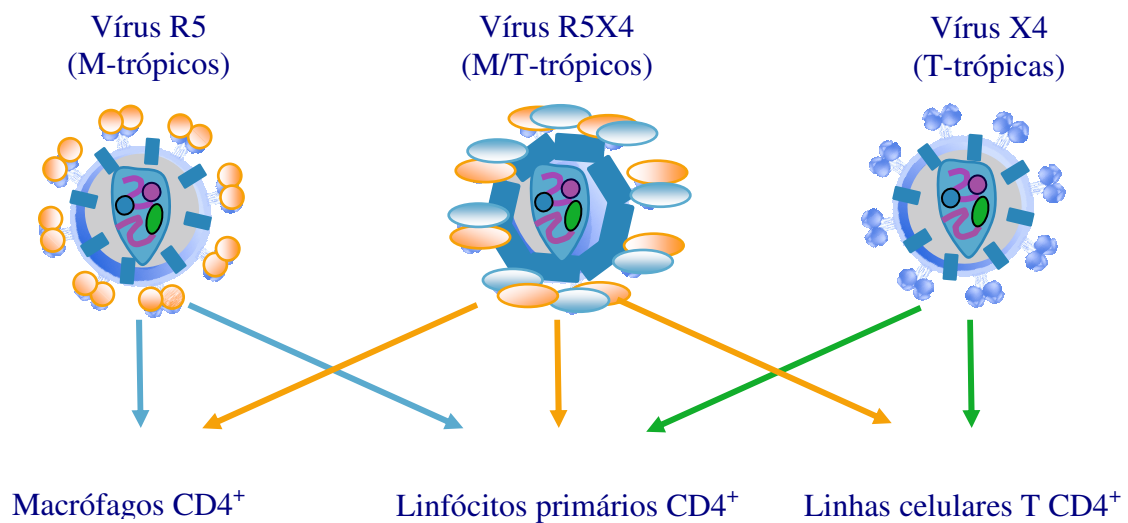


**Figura 7:** Esquema do processo de fusão. A: TM constituída por regiões *heptad repeat* (HR1 e HR2) B: Formação da estrutura termoestável super-enrolada em hélice sêxtupla, pela interacção entre trimeros HR1 e HR2. C: Fusão da membrana celular e viral através da formação do poro de fusão. (Adaptado de Poveda *et al*, 2005).

Durante a formação desta hélice sextupla a glicoproteína TM fica vulnerável, podendo ocorrer inibição por um péptido sintetizado com uma sequência idêntica às regiões HR1, como o DP-107 (péptido N) ou a região HR-2, como a enfuvirtida (péptido C-terminal), uma vez que a formação da hélice sêxtupla não é instantânea.

## 1.6. Tropismo Celular

O tropismo do VIH para os co-receptores está relacionado com a capacidade de replicação dos vírus em diferentes células.<sup>11, 76, 138</sup> O tropismo celular é determinado tal como referi anteriormente, pela capacidade de utilização dos diferentes co-receptores, em particular o CCR5 e o CXCR4 (Figura 8).<sup>8, 11, 76, 138</sup>



**Figura 8:** Tropismo celular do VIH. (adaptado de <http://www.clinicalcareoptions.com/...../CCO%20Slidesets/Doms.aspx>)

Os vírus R5, utilizam única e eficazmente o co-receptor CCR5 e infectam preferencialmente linhas celulares macrofágicas, sem capacidade de indução de sincícios e com taxa de replicação lenta/baixa. São obtidos em todas as fases da infecção,<sup>12, 18, 23</sup> mas predominam na fase assintomática da doença.<sup>76</sup>

Na infecção pelo VHI-1, alguns autores observaram que os vírus R5 são responsáveis pelas novas infecções.<sup>12, 76</sup> Apesar de ser um acontecimento excepcional, pode acontecer uma infecção primária mediada e sustentada por estirpes X4 em indivíduos homozigóticos para uma deleção no gene *ccr5*.<sup>8</sup>

Por outro lado, os vírus R5X4 (M/T-trópicos) utilizam indiferenciadamente o CCR5 e o CXCR4, tendo uma capacidade de replicação idêntica em macrófagos e linhas celulares linfocíticas.<sup>11, 76, 138</sup>

Por último, os vírus X4 (estirpes T-trópicas) usam o co-receptor CXCR4, infectam principalmente linhas linfocíticas, possuem a capacidade de induzir a formação de sincícios, apresentam uma rápida e elevada taxa de replicação e são isolados nas fases tardias da infecção.<sup>8, 12, 23</sup> Só em cerca de 50% dos casos de indivíduos infectados com VIH-1 acontece um predomínio de estirpes X4 na fase sintomática, precedendo um acelerado declínio das células CD4 e um desenvolvimento progressivo da doença.<sup>23, 76</sup> Há que salientar que o aparecimento desta estirpe está normalmente associado a dois factores, uma diminuição acentuada do número de células T CD4<sup>+</sup> e à progressão da doença.<sup>18, 86</sup>

Na infecção pelo VIH-2, os vírus R5 são isolados de indivíduos assintomáticos enquanto os vírus X4 são apenas encontrados em indivíduos em estado avançado de doença.<sup>26</sup> No entanto, a evolução de vírus R5 para X4 ao longo da progressão da doença não é evidente, uma vez que muitos isolados primários utilizam vários co-receptores incluindo o CCR5 e o CXCR4,<sup>8</sup> independentemente da fase clínica em que o indivíduo infectado se encontra.

Tanto o VIH-1 como a maioria das estirpes de VIH-2 usam o CCR5 e/ou CXCR4 como principais co-receptores para a entrada nos linfócitos T CD4<sup>+</sup>.<sup>8</sup> Contudo, uma das características mais relevantes das estirpes de VIH-2 é a capacidade de utilização de uma gama mais alargada de co-receptores, utilizando-os em alguns casos, de modo tão eficaz como usam o CCR5 e o CXCR4.<sup>8, 6, 17, 27, 94, 97, 108</sup> Tal facto sugere que a estrutura oligomérica das glicoproteínas do invólucro do VIH-2 é mais flexível do que a do VIH-

1.<sup>8</sup> Por outro lado, esta promiscuidade no uso de co-receptores parece não estar relacionada com a sua patogenicidade.<sup>8, 17, 97, 123</sup>

### **1.7. Utilização de co-receptores independentemente do CD4**

Clapham e seus colaboradores descreveram pela primeira vez isolados de VIH-2 que infectavam células independentemente do CD4,<sup>26</sup> tendo sido reforçada mais tarde essa particularidade do VIH-2.<sup>7</sup> Outros estudos realizados vieram ainda demonstrar que esta característica estava presente também em outras estirpes de VIH-1 e do VIS.<sup>124, 122, 146</sup>

Dados descritos em vários artigos sugerem que estes vírus possuem uma glicoproteína SU nativa, em que o local de ligação ao co-receptor está total ou parcialmente exposto, o que possibilita a interacção directa com o co-receptor, sem a necessidade de alteração conformacional provocada pela ligação ao CD4.<sup>15, 59, 124</sup> Porém, esta via é relativamente menos eficaz do que a via normalmente utilizada.<sup>12, 146</sup>

Conforme sugerido por alguns autores, a utilização da molécula CD4 como receptor constitui uma vantagem adaptativa, não só no que respeita a uma melhor adesão às células alvo, mas também como forma de protecção das regiões conservadas necessárias à interacção com o co-receptor e potenciais alvos importantes dos anticorpos neutralizantes.<sup>123, 146</sup> Desta forma, as estirpes de VIH CD4-independentes, são mais sensíveis à acção dos anticorpos neutralizantes do que os vírus dependentes do CD4.<sup>8, 15, 124, 146</sup> Estas estirpes que conseguem infectar células que expressam níveis baixos de CD4, podem apresentar vantagens quando o número de anticorpos neutralizantes é baixo, como no caso dos progressores rápidos e nos doentes em fase terminal da doença, após falência dos sistema imunitário.<sup>15</sup>

## **1.8. Terapêutica anti-retrovírica**

Desde a implementação da terapêutica anti-retroviral de alta eficiência (HAART), que consiste na combinação de vários fármacos com diferentes alvos terapêuticos para o tratamento da infecção pelo VIH, tem-se verificado uma significativa redução da mortalidade, morbilidade e melhoria da função do sistema imunológico dos indivíduos infectados.<sup>109</sup>

No entanto, a falta de adesão ao regime terapêutico, o desenvolvimento de resistências aos fármacos, bem como a toxicidade que lhe estão associados, são condições limitativas ao sucesso terapêutico de forma mais abrangente. De qualquer forma, todos estes factores poderão ser motivantes para a pesquisa de novas moléculas que actuem em diferentes etapas do ciclo viral e que não apresentem resistência cruzada com os antiretrovirais já existentes, contribuindo assim para reforçar o arsenal terapêutico no controlo da infecção.<sup>90</sup>

Até à data existem cinco classes de fármacos disponíveis: os inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleósídeos (ITRN), os inibidores da transcriptase reversa não análogos dos nucleósídeos (ITRNN), os inibidores da protease (IP) e mais recentemente, os inibidores de entrada (antagonistas do CCR5, do CXCR4 e inibidor de fusão) e os inibidores da integrase.<sup>20, 90</sup>

### **1.8.1. Antagonista do CCR5 e o seu mecanismo de inibição**

Muitos dos antagonistas do CCR5 são pequenas moléculas que inibem a entrada do VIH na célula alvo, bloqueando a interacção entre a SU e o CCR5.<sup>41, 148</sup> Embora este

mecanismo molecular ainda não esteja totalmente descrito, os dados existentes sugerem que os antagonistas inibem a entrada viral através de efeitos alostéricos.<sup>75, 149</sup>

Em 1999, foi descoberta a primeira molécula antagonista do CCR5, o TAK-779, com capacidade de bloquear *in vitro* a replicação dos vírus R5.<sup>9</sup> Após esta descoberta inicial, outras moléculas foram identificadas como novos antagonistas do CCR5.

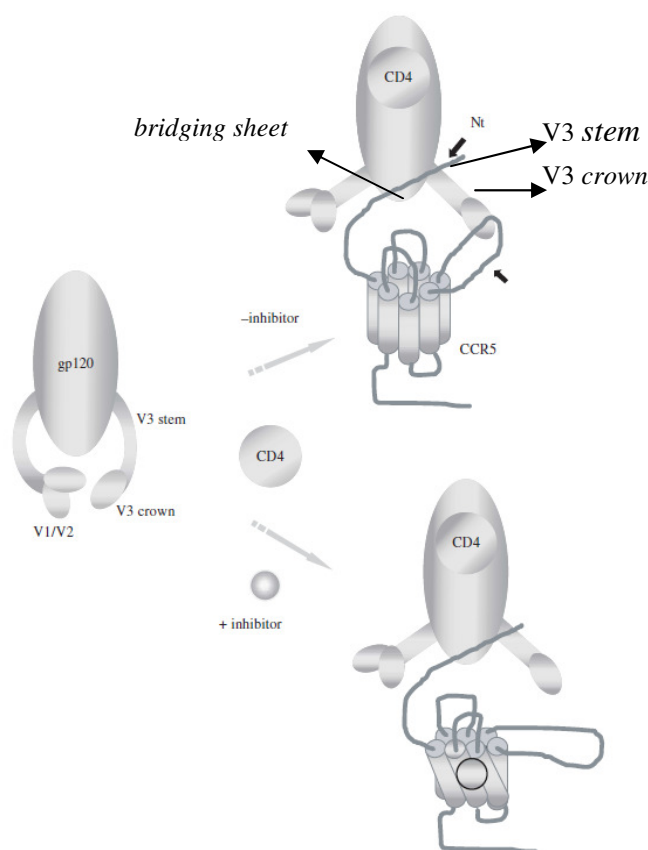
Em 2005, um estudo de Dorr e colaboradores, concluiu que o Maraviroc (MVC) se comporta como um antagonista funcional do co-receptor CCR5.<sup>40</sup> Segundo este estudo, este inibidor bloqueia os eventos de transdução de sinal após a ligação das quimiocinas. Além disso, a sua ligação ao CCR5, não provoca a libertação de cálcio intracelular, nem a regulação negativa da expressão do co-receptor.<sup>40</sup> O MVC inibe a ligação das quimiocinas CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ) e CCL5 (RANTES), também conhecidas como ligandos naturais do CCR5.<sup>40, 44</sup>

Desde Agosto de 2007 que o MVC (Celsentri<sup>®</sup>, Pfizer) foi aprovado para uso clínico pela *Food and Drug Administration* (FDA)<sup>44, 46</sup> com base em dois estudos, o MOTIVATE 1 e 2. Estes estudos após 48 semanas de tratamento (fase III), demonstraram a segurança e a eficácia deste inibidor em doentes infectados pelo VIH-1 com tropismo para CCR5 e uma carga viral plasmática superior a 5000 cópias/ml, os quais tinham sido previamente submetidos a terapêutica anti-retrovírica.<sup>44, 56, 67</sup> A análise combinada dos resultados demonstrou uma supressão virológica significativa, isto é, 56,1% dos doentes que tomaram duas vezes por dia o MVC reduziram a carga viral para níveis indetectáveis, inferiores a 400 cópias/ml, em comparação com os doentes que receberam apenas um regime terapêutico sem o MVC. Verificou-se ainda uma recuperação do sistema imunitário, havendo uma diferença significativa na taxa de recuperação do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos doentes que receberam o MVC.<sup>44, 56</sup>

Um outro estudo mais recente, MERIT, foi realizado em doentes infectados pelo VIH-1 com tropismo para o CCR5, sem tratamento prévio e com uma duração de 96 semanas.

Este estudo teve como objectivo a comparação e avaliação da eficácia do tratamento com Maraviroc (30mg) *versus* Efavirenz (EFV, 60mg), ambos em associação com o Combivir (Lamivudina/Zidovudina; 3TC/ZDV).<sup>93</sup> Segundo este estudo, a dose de 300 mg de MVC administrada duas vezes por dia (complementada com lamivudina/zidovudina) tem uma eficácia virológica semelhante ao Efavirenz com o Combinivir, tendo uma elevada probabilidade de sucesso neste grupo de doentes e com boa adesão à terapêutica.<sup>93</sup>

Estudos usando o VIH-1 mostram que, sem antagonistas do CCR5, os resíduos localizados no *bridging sheet* e o *V3 stem* se ligam a região N-terminal do CCR5, onde o ECL2 interage com o *V3 crown*.<sup>20, 34, 62</sup>



**Figura 9:** Modelo do mecanismo de acção de pequenas moléculas inibidoras do CCR5. Nt, N-terminal. (Adaptado de Briz *et. al.*, 2006).



Na presença do MVC, quando este se liga às hélices 2, 3, 6 e 7 existentes na cavidade transmembranar do CCR5 e não ao V3 *crown* como se mostra na figura 9, a conformação da ECL2 do co-receptor CCR5 é modificada.<sup>20, 40</sup> Assim, o CCR5 fica bloqueado, não permitindo a ligação da sub-unidade viral SU, o que impede a mudança conformacional da TM, impedindo a entrada da partícula viral na célula hospedeira.

O Vicriviroc (VCV) é o mais recente antagonista do CCR5, que se encontra em fase de desenvolvimento clínico.<sup>44</sup> Um estudo desenvolvido durante 24 semanas, por Zingman e colaboradores, teve como objectivo determinar a dose óptima do Vicriviroc, para garantir a eficácia do fármaco e a segurança do tratamento em doentes infectados com VIH-1 previamente submetidos à terapia anti-retroviral.<sup>159</sup> Dados deste estudo, mostraram que os doentes que tomaram o VCV (30mg) uma vez por dia, obtiveram uma descida significativa da carga viral e um aumento na contagem das células CD4<sup>+</sup>, quando comparados com os doentes que tomaram placebo.<sup>159</sup>

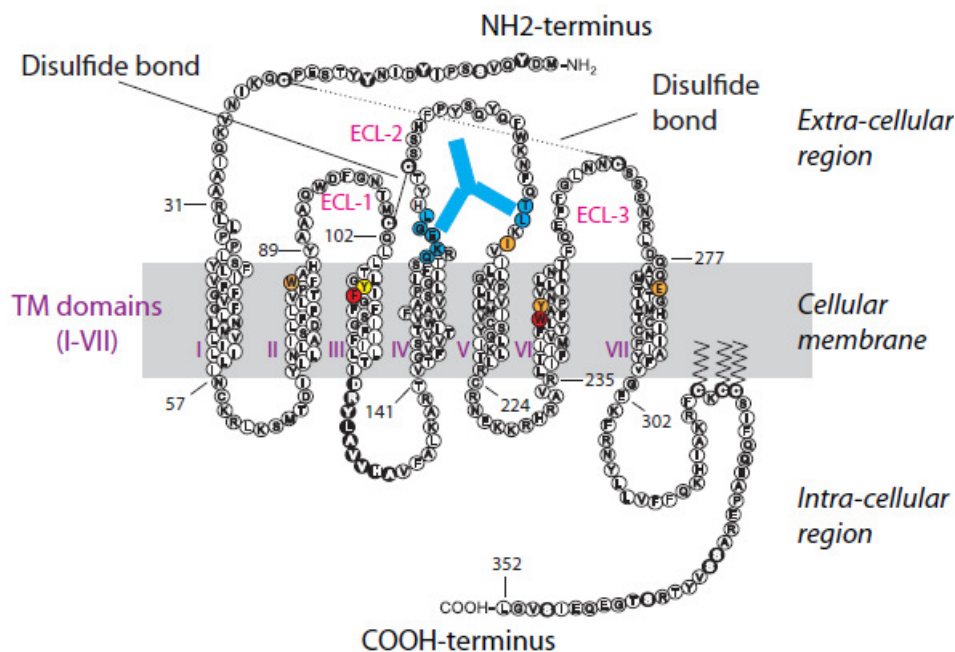
O mecanismo de acção destes fármacos apresenta uma diferença muito importante relativamente a outros antiretrovirais já existentes. Enquanto os inibidores da transcriptase reversa e da protease diminuem ou inibem a replicação viral somente após a entrada do vírus na célula, actuando sobre alvos virais; os inibidores de entrada têm como alvo proteínas celulares, pelo que o desenvolvimento de resistências devido a alterações nos co-receptores não é espectável. Desta forma, estes inibidores poderão ser uma promissora opção terapêutica para doentes infectados com estirpes de VIH resistentes a outros antiretrovirais.

A fim de se obter um melhor conhecimento da interacção entre os antagonistas do CCR5 e respectivo co-receptor, têm sido realizados vários estudos utilizando técnicas como a mutagénesis dirigida e a modelagem molecular do CCR5.<sup>41, 72, 105, 133, 148</sup> Estes revelaram a existência de aminoácidos chave do CCR5, localizados no domínio

transmembranar, que estão envolvidos na ligação do inibidor ao co-receptor impedindo a ligação do VIH ao CCR5.

Um destes estudos, realizado por Khurana e colaboradores, demonstrou que a ligação do anticorpo monoclonal 2D7 é feita na região extracelular do co-receptor CCR5 (Figura 10).<sup>72</sup>

Mais recentemente foi demonstrado que os principais aminoácidos envolvidos na interacção do MVC ao CCR5 são: E283 na TM7, Y251 na TM6, I198 na TM5, Y108 na TM3 e W86 na TM2.<sup>75</sup> Estes aminoácidos também interagem na ligação do TAK-779 ao CCR5, embora só se tenha verificado uma forte interacção do TAK-779 com o Y108 na TM3 e o W86 na TM2.<sup>75</sup> Este sugere ainda que o W86 na TM2 muda a conformação do CCR5 quando interage com o TAK-779 e o MVC.<sup>75</sup>



**Figura 10:** Aminoácidos envolvidos na interacção do mAb 2D7, TAK-779 e MVC com o co-receptor CCR5. O rectângulo cinzento representa as sete regiões transmembranares. (Adaptado de Oppermann *et al.* 2004, Khurana *et al.* 2005 e Kondru *et al.* 2008)

As pequenas variações na conformação das ansas extracelulares do CCR5 podem resultar em diferenças significativas na sensibilidade do vírus a um determinado inibidor e na resistência viral a este tipo de fármaco.

Há dois mecanismos prováveis de resistência aos inibidores dos co-receptores, sendo eles: a resistência competitiva e a resistência não competitiva, por analogia com inibição competitiva e não competitiva.<sup>78, 120</sup> Os mecanismos que podem levar à ocorrência destas resistências são: selecção de estirpes não CCR5,<sup>153</sup> mudança do tropismo viral para outro co-receptor<sup>105, 153</sup> e mutações nas sequências de aminoácidos das regiões da glicoproteína SU<sup>20</sup> que interagem com o co-receptor, criando a possibilidade de ligação do vírus a outros locais do co-receptor, mesmo na presença do inibidor.<sup>105, 152</sup>

É de realçar ainda que o uso destes inibidores traz implicações muito particulares, todas elas baseadas na relação entre o uso dos co-receptores com o tropismo celular e a patogénese viral.

Uma vez que estes inibidores impedem a ligação do vírus ao co-receptor CCR5, pode ocorrer uma transição da população viral com tropismo R5 para X4, já pré-existente nos reservatórios celulares do hospedeiro, como foi demonstrado por Westby e colaboradores quando administraram MVC em doentes infectados com VIH-1.<sup>153</sup>

Assim, o uso destes inibidores na prática clínica, requer um rastreio prévio, que possibilite a identificação e selecção dos indivíduos infectados que possuam uma só população viral R5 e um acompanhamento do doente ao longo da terapêutica.

Por outro lado, devido à contínua replicação viral das variantes X4 haverá uma maior acumulação de mutações e consequente infecção de um maior número de células. Sendo a sua taxa de replicação mais elevada, responsável por uma depleção mais rápida dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e por cargas virais mais elevadas.

## 2. Objectivo

Vários avanços têm sido feitos na terapêutica anti-retroviral, destacando-se o contínuo surgimento de novas classes de fármacos anti-retrovirais. Os inibidores de entrada são uma promissora opção terapêutica para doentes infectados com estirpes de VIH resistentes a outros anti-retrovirais.

Contudo, é importante realçar que Portugal é o país da Europa onde existe uma percentagem mais elevada de doentes infectados pelo VIH-2, e que a maioria dos testes realizados com estes fármacos utilizaram apenas estirpes VIH-1, não existindo até à data dados relativos à susceptibilidade do VIH-2 a estes inibidores.

Assim, tornou-se na demanda deste trabalho, determinar a susceptibilidade à neutralização por moléculas inibidoras do CCR5 [TAK-779, anticorpo monoclonal (mAb) 2D7, Maraviroc e PF-221573] e do CXCR4 (mAb 12G5 e o SDF1- $\alpha$ ), por parte de seis estirpes VIH-2 isoladas e caracterizadas previamente, tendo como controlo a estirpe HIV-1<sub>BaL</sub>.

## 3. Procedimento experimental

### 3.1. Cultura de células

As Células Mononucleadas do Sangue Periférico (CMSP), de diferentes dadores não infectados pelo VIH e com genótipo *wild-type* no gene *ccr5* (*wtccr5*), foram isoladas a partir de sangue total pelo método de Gradiente de Ficoll, (Ficoll-HyPaque, Pharmacia Biotech) para separar os diferentes constituintes do sangue.

As CMSP dos dadores foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 (GIBCO™) suplementado com 15% (v/v) de Soro Bovino Fetal (GIBCO™) descomplementado, L-glutamina (300µg/l; GIBCO™), gentamicina (50 µg/ml; GIBCO™), polibrene (3µg/ml; SIGMA®) fungizona (250µg/ml; GIBCO™) e interleucina-2 humana recombinante (20 U/ml; Roche).

A linha celular de osteosarcoma humano, GHOST, e as linhas celulares derivadas desta expressando os co-receptores CXCR4 e CCR5, provenientes do NIBSC Centralised Facility for AIDS Reagents, foram cultivadas em monocamada em meio Dulbecco's modified Eagle's Medium, com piruvato de sódio e L-glutamina (DMEM; GIBCO™) suplementado com Soro Bovino Fetal (GIBCO™) descomplementado (10%), fungizona (250µg/ml; GIBCO™), gentamicina (50 µg/ml; GIBCO™), geneticina (500 µg/ml; GIBCO™), higromicina (100µg/ml; Roche) e puromicina (1µg/ml; SIGMA®).

### 3.2.Extracção de ADN genómico a partir de sangue total periférico

A extracção do ADN genómico foi efectuada a partir de 300 µl de sangue total utilizando o Kit comercial PUREGENE DNA Purification (Gentra Systems), de acordo com as instruções do fabricante.

### 3.3.Detecção por PCR da mutação $\Delta 32$ no gene *ccr5*

O polimorfismo do gene CCR5 na região 5'UTR foi detectado através de amplificação por reacção de polimerização em cadeia (PCR) com os *primers* CCR5-R, CCR5-F já descritos na literatura (Tabelas 1).<sup>6</sup>

**Tabela 1** – *Primers* utilizados nas reacções de amplificação por PCR

<i>Primers</i>	Sequência nucleotídica (5' – 3')
CCR5-F	CCTGGCTGTCGTCCATGCTG
CCR5-R	AGCCATGTGCACAACTCT

Para a realização desta reacção usou-se: puRe Taq Ready-To-Go PCR Beads (Amersham Biosciences) e água sem nucleases (Nuclease-Free Water, Promega). A mistura de reacção e as condições da reacção de PCR encontram-se descritas nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Mistura de reacção e parâmetros das reacções de PCR

Mistura de reacção
Taq/Pwo DNA polymerase mix
Primer 1 (10µM) - 2µl
Primer 2 (10µM) - 2µl
H <sub>2</sub> O – 18 µl
ADN – 3 µl

**Tabela 3** – Parâmetros das reacções de PCR

Condições da Reacção	
94°C ---- 2 minutos	
94°C ---- 30 segundos	} 35 ciclos
60°C ---- 45 segundos	
68°C ---- 90 segundos	
68°C ---- 10 minutos	

A deleção homozigótica de 32 pares de bases no gene CCR5 foi detectada pela amplificação por reacção de polimerização em cadeia (PCR) e posterior electroforese em gel de agarose a 2 %, utilizando os *primers* CCR5-R, CCR5-F, e protocolos descritos na literatura. <sup>6</sup>

### 3.4. Vírus

As estirpes primárias de VIH-2 utilizadas neste trabalho foram obtidas a partir das CMSP de indivíduos infectados, por co-cultura com CMSP de dadores não infectados pelo VIH, na URIA-CPM, Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa.

### 3.5. Stock Viral

Para produção de um novo *stock* viral utilizaram-se alíquotas de *stocks* virais antigas guardados a -80°C. Estas foram co-cultivadas, durante 30 dias, com CMSP de dadores seronegativos e previamente estimuladas durante 3 dias com o mitogénio fito-hemaglutinina (0,5% v/v; Pha-P, SIGMA®), em RPMI 1640 (GIBCO™) suplementado com 15% de Soro Fetal de Bovino (GIBCO™) descomplementado, L-glutamina (2mM; GIBCO™), gentamicina (50µg/ml; GIBCO™), fungizona (250µg/ml; GIBCO™) polibrene (3µg/ml; SIGMA®) e interleucina-2 humana recombinante (20U/ml; Roche), numa estufa com atmosfera húmida, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

A detecção do VIH na cultura foi realizada por detecção do antígeno p24 (Agp24) (Vironostika HIV-1 Antigen, BioMérieux) e por observação directa do efeito citopático nas células, ao microscópio invertido. Cerca de 75% do meio de cultura foi renovado de três em três dias. A replicação vírica foi monitorizada pela actividade da transcriptase reversa (RT) nos sobrenadantes das culturas de acordo com as instruções do fabricante (Lenti-RT kit, Cavid), De seguida, os sobrenadantes foram filtrados com um filtro de 0,2µm, alíquotados e armazenados a -80°C até serem usados.



### 3.6. Ensaios de infecciosidade

As CMSP e as células GHOST, que expressam CD4 e CXCR4 ou CCR5, foram cultivadas em placas de 48 poços, 24 horas antes da infecção, numa concentração celular de  $5 \times 10^5$  e  $3 \times 10^4$ /poço, respectivamente. Cada linha celular foi incubada com a mesma quantidade de vírus (0,06 ng/ml e 0,01 ng/ml RT de vírus num volume total de 150 µl), durante três horas a 37°C na presença de 3 µg/ml de polibrene (SIGMA®). As células foram lavadas com PBS (GIBCO™), cultivadas num volume de 150 µl de RPMI completo ou DMEM completo e mantidas em cultura durante 15 dias. Durante este período, as células foram lavadas com PBS e o meio de cultura foi sendo removido sempre que necessário.

A replicação vírica foi monitorizada pela detecção do antígeno p24 (Ag p24) (INNOTEST HIV Antigen mAb, Quilaban), de três em três dias após a infecção.

### 3.7. Ensaios de inibição

A linha celular GHOST expressando CD4 e CXCR4 ou CCR5 foi colocada em placas de 48 poços numa densidade celular de  $3 \times 10^4$ /poço e incubadas *overnight* numa estufa com atmosfera húmida, a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Estas células foram incubadas com as concentrações correspondentes a IC<sub>50</sub> e EC<sub>50</sub> para os vários inibidores, TAK-779, anticorpos monoclonais (MAb) 2D7, 12G5, Maraviroc, PF-221573 e SDF-1α durante uma hora. Após esse tempo os vírus foram adicionados, conforme descrito nos ensaios de infecciosidade. As células infectadas foram mantidas em meio de cultura com as concentrações desejadas de cada inibidor. Os níveis de replicação viral, na presença das várias concentrações de inibidor, foram relacionados com o nível de replicação verificado nas culturas sem inibidor.

## 4. *Resultados*

### 4.1. Produção de *stocks* virais

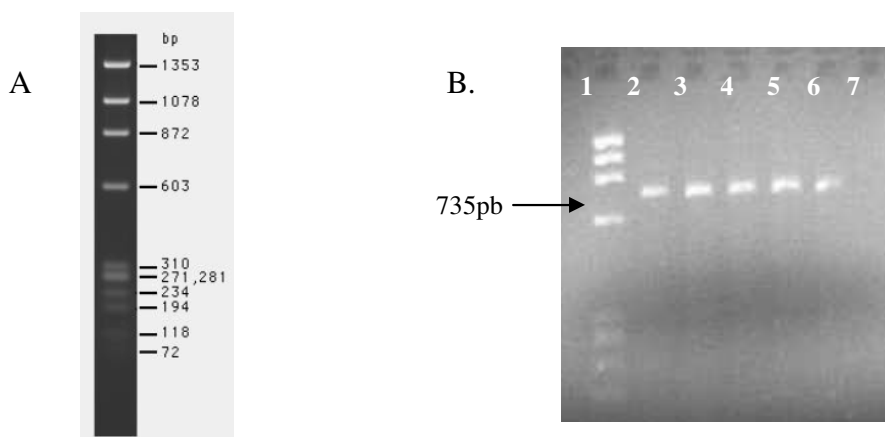
Para garantir que a produção de um novo *stock* viral é o mais semelhante possível aos *stocks* virais originais, é necessário ter uma população linfocitária que não seleccione outras subpopulações virais. Para tal, é necessário fazer uma detecção por PCR da mutação  $\Delta 32$  no gene *ccr5*, a fim de confirmar a inexistência desta mutação nas CMSP utilizadas, que pudesse ser directamente responsável pela selecção de uma subpopulação viral não-CCR5.

Esta mutação foi identificada como responsável pela ausência ou expressão diminuída do co-receptor CCR5,<sup>129</sup> verificando-se também que esta deleção influencia a susceptibilidade da infecção pelo VIH-1 e a progressão para a doença.

De forma a garantir a inexistência da deleção  $\Delta 32$  no gene *ccr5* nas CMSP, amplificou-se o ADN genómico das CMSP de dadores saudáveis usados na infecção pela reacção de

PCR efectuada com o par de *primers* CCR5R (5'- AGCCATGTGCACAACTCT- 3') e CCR5F (5'-CCTGGCTGTCGTCCATGCTG-3'), conforme descrito anteriormente<sup>6</sup>.

As análises das amostras em estudo depois de amplificadas, foram realizadas por separação electroforética num gel de agarose a 2%, tendo-se verificado que nenhum dos dadores usados era homozigótico ou heterozigótico para este tipo de deleção, dando portanto origem a uma única banda com 735 pb (homozigótico selvagem\_ *ccr5* / *ccr5*) (Figura 11).



**Figura 11-** Detecção por PCR da mutação  $\Delta 32$  gene *ccr5*; A - marcador de pesos moleculares (  $\phi$ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen); B- Observação dos produtos de PCR. Identificação das pistas: 1- marcador de pesos moleculares (  $\phi$ X174 RF DNA/*Hae* III Fragments, Invitrogen); 2 a 5 – amostras de ADN genómico dos CMSP; 6-Controlo positiva; 7- controlo negativo.

#### 4.1.1. Determinação do fenótipo viral

Os ensaios de infecciosidade foram realizados usando linhas celulares GHOST que expressam CD4, CXCR4 ou CCR5 e as CMSP, com o objectivo de se confirmar o perfil de utilização dos co-receptores por parte das estirpes VIH-2.

A monitorização das amostras foi efectuada através da actividade da transcriptase reversa e da detecção do antígeno p24 ambos nos sobrenadantes de cultura.

Tendo-se verificado nos ensaios preliminares que existia uma grande discrepância entre os dois métodos de monitorização quando se utilizou a linha celular GHOST, pois obtinham-se valores muito elevados na detecção de antígeno p24 e valores negativos na detecção de transcriptase reversa. Decidiu-se então fazer uma revisão do procedimento experimental para ambos os métodos, chegando-se à conclusão de que não existia nenhum ponto crítico experimental que pudesse justificar as discrepâncias verificadas.

Como os valores obtidos pela detecção do antígeno p24 sugeriam uma infecção, e estando de acordo com a análise da morfologia celular por microscopia, onde se observava a presença de sincícios e/ou alterações morfológicas nas células, decidiu-se utilizar somente o teste de detecção de antígeno p24.

Na tabela 4 estão representados os valores obtidos pela detecção de antígeno p24, revelando que a maior parte das estirpes VIH-2 estudadas (HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub>, HIV-2<sub>MMS</sub>, HIV-2<sub>ADC.05</sub>, HIV-2<sub>SAB</sub>) são de tropismo duplo ou misto (CXCR4 e CCR5), existindo apenas duas estirpes (HIV-2<sub>ALI</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub>) que só utilizam eficazmente o CCR5. Estes resultados têm em consideração a média de pelo menos três experiências independentes.

**Tabela 4** – Caracterização das estirpes VIH-2, utilizando células GHOST que expressam CD4 e CCR5 ou CXCR4 e as CMPS.

Estirpes	Fase Clínica*	CMSP**	Células GHOST CD4 <sup>+</sup> expressando**	
			CCR5	CXCR4
HIV-2 <sub>MS</sub>	Sint (A2)	+++	+++	+++
HIV-2 <sub>ALI</sub>	Sint (B3)	++	+	-
HIV-2 <sub>ABG.01</sub>	Sint (B2)	+++	+	-
HIV-2 <sub>MMS</sub>	Assint (A2)	+++	+++	+++
HIV-2 <sub>ADC.05</sub>	Sint (B3)	+++	+++	+++
HIV-2 <sub>SAB</sub>	Sint (C3)	+++	+++	+++

Vírus com valores de antígeno; (-) O.D. <0,290±0,010; (+) 0,290 < O.D.<1,500; (++) 1,500 < O.D.< 2,500; (+++); O.D. > 2,500.

\* A classificação da fase clínica foi feita de acordo com o preconizado pelo CDC. (22) ([http://www.aidsctc.org/aidsctc?page=cm-105\\_disease#S6X](http://www.aidsctc.org/aidsctc?page=cm-105_disease#S6X))

\*\* A replicação viral foi detectada pela presença de Ag p24 no sobrenadante das culturas.

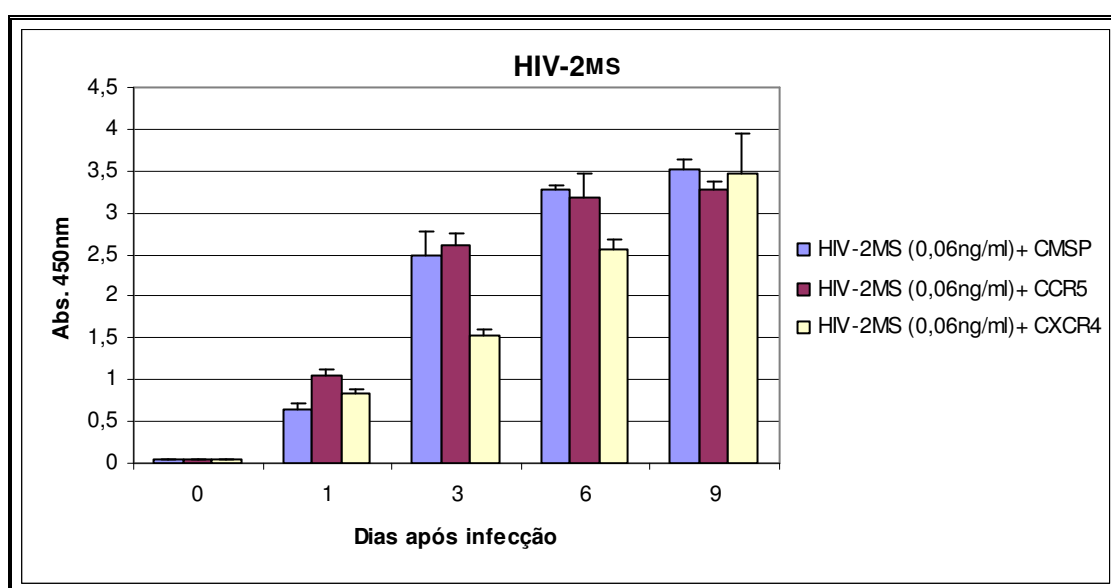
#### 4.1.2. Análise da capacidade replicativa das estirpes

Após a confirmação das características fenotípicas de cada estirpe em estudo, procedeu-se à análise da capacidade de infecção de cada uma delas ao longo do tempo. Esta análise foi feita nas CMSP e nas células GHOST expressando CD4 e um dos diferentes co-receptores (CCR5, CXCR4) (Tabelas 5); o inóculo viral de cada estirpe em estudo foi normalizado em termos de igual actividade de RT dos respectivos inóculos.

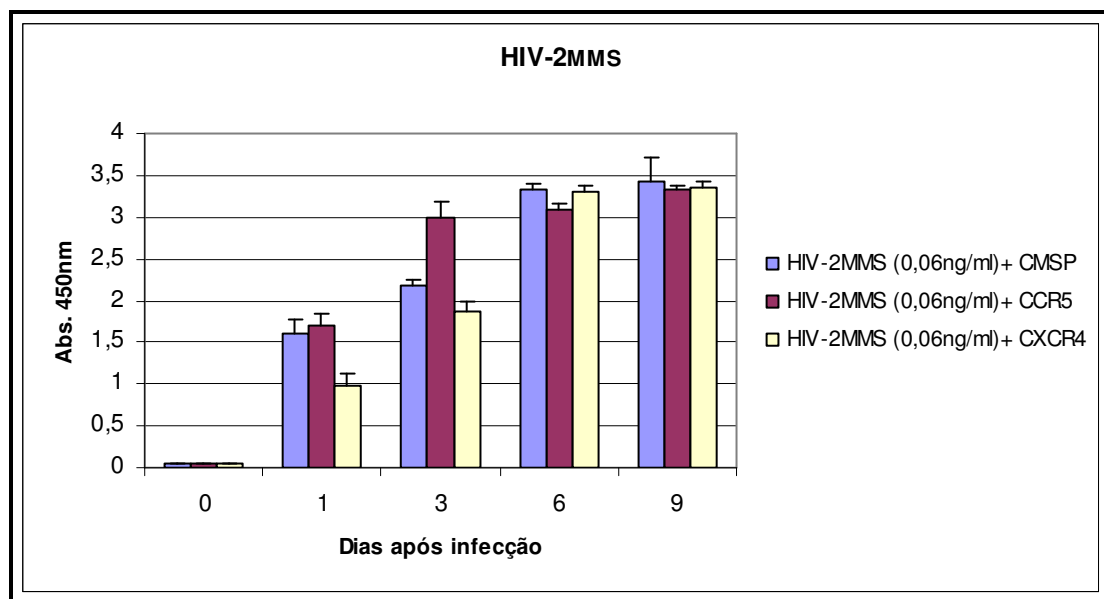
**Tabela 5** - Valores da transcriptase reversa (RT) do *stock* viral

Estirpes	Abs 405nm	Regressão linear (pg/ml)	ng/ml	Vol para 1ng/ml
HIV-1 <sub>Bal</sub>	1,4218	1579,778	1,580	0,633
HIV-2 <sub>MS</sub>	1,5198	1688,667	1,689	0,592
HIV-2 <sub>ALI</sub>	1,5560	1728,889	1,729	0,578
HIV-2 <sub>ABG.01</sub>	1,6300	1811,111	1,811	0,552
HIV-2 <sub>SAB</sub>	1,6797	1866,333	1,866	0,536
HIV-2 <sub>MMS</sub>	1,8969	2107,667	2,108	0,474
HIV-2 <sub>ADC.05</sub>	1,8477	2053,000	2,053	0,487

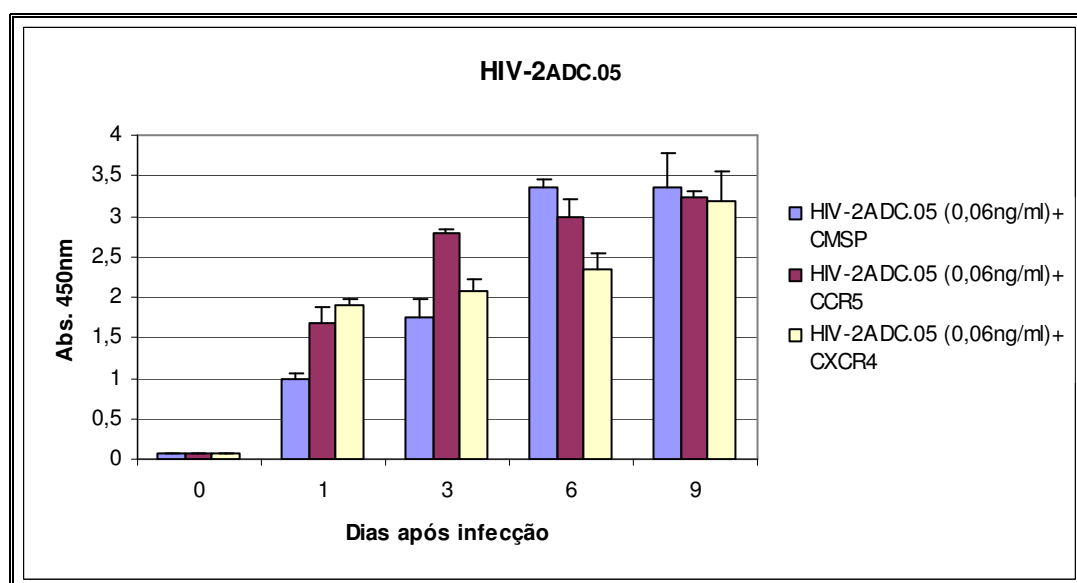
Com base no nível de actividade da RT para o HIV-2<sub>MS</sub> (Tabela 5), usou-se um inóculo com uma concentração de 0,06 ng/ml para infectar a linha celular GHOST e CMSP. Através da detecção do antígeno p24 obtiveram-se os resultados da infecção (Figura 12), tendo-se demonstrado que ao fim do nono dia, esta estirpe tinha uma produção viral praticamente idêntica entre as diferentes células.

**Figura 12** – Análise da capacidade replicativa do HIV-2<sub>MS</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4.

Relativamente às estirpes HIV-2<sub>MMS</sub> e HIV-2<sub>ADC.05</sub> (Figuras 13 e 14), usando inóculos normalizados (0,06ng/ml) pelo nível de actividade da RT, observou-se que a replicação viral era praticamente igual ao fim do sexto e do nono dia, tendo ambos uma boa capacidade de infecção para todas as linhas celulares utilizadas. Verificou-se ainda que a replicação viral era praticamente idêntica à observada no caso do HIV-2<sub>MS</sub>.



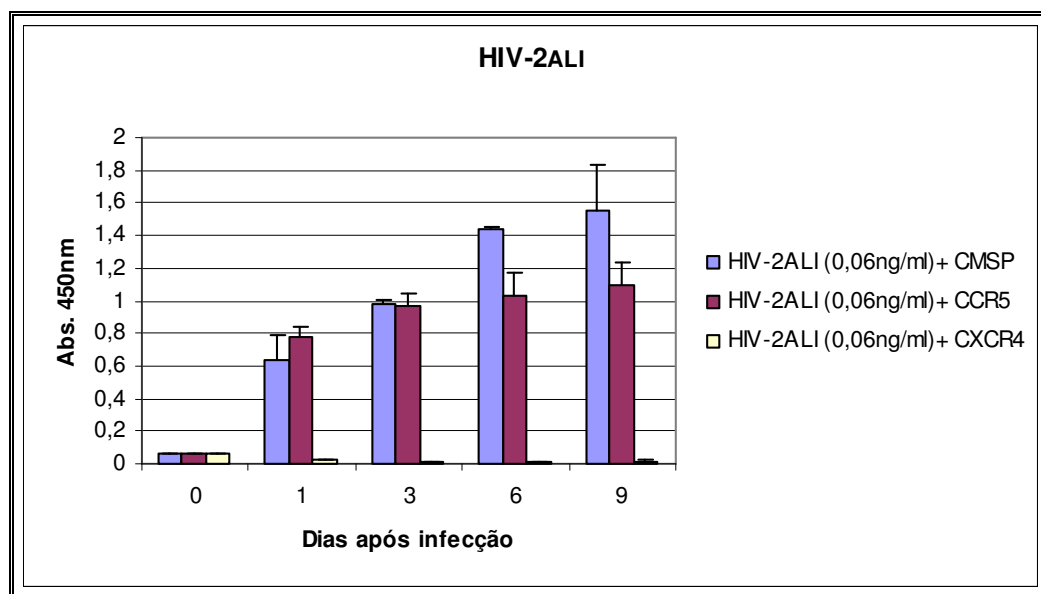
**Figura 13** – Análise da capacidade replicativa do HIV-2<sub>MMS</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4.



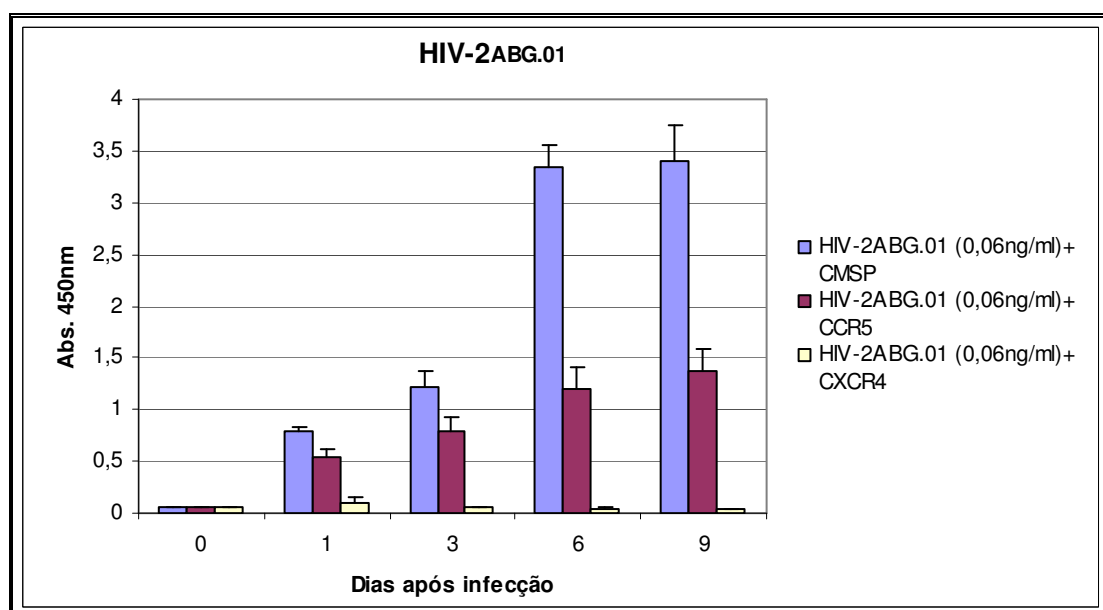
**Figura 14** – Análise da capacidade replicativa do HIV-2<sub>ADC.05</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4.

Relativamente as outras estirpes em estudos, HIV-2<sub>ALI</sub> e HIV-2<sub>ABG.01</sub>, verificou-se que apesar de continuarem a ter uma boa capacidade replicativa ao fim do nono dia, estas estirpes apenas utilizaram eficazmente o CCR5 (Figura 15 e 16).

Há que realçar ainda a existência de uma grande diferença entre a replicação do HIV-2<sub>ABG.01</sub> nas CMSP e nas GHOST-CCR5, o que nos leva a supor que esta estirpe poderá estar a utilizar eficazmente outro co-receptor (presente nas CMSP) para além dos estudados (CCR5 e CXCR4).



**Figura 15**– Análise da capacidade replicativa do HIV-2<sub>ALI</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4.



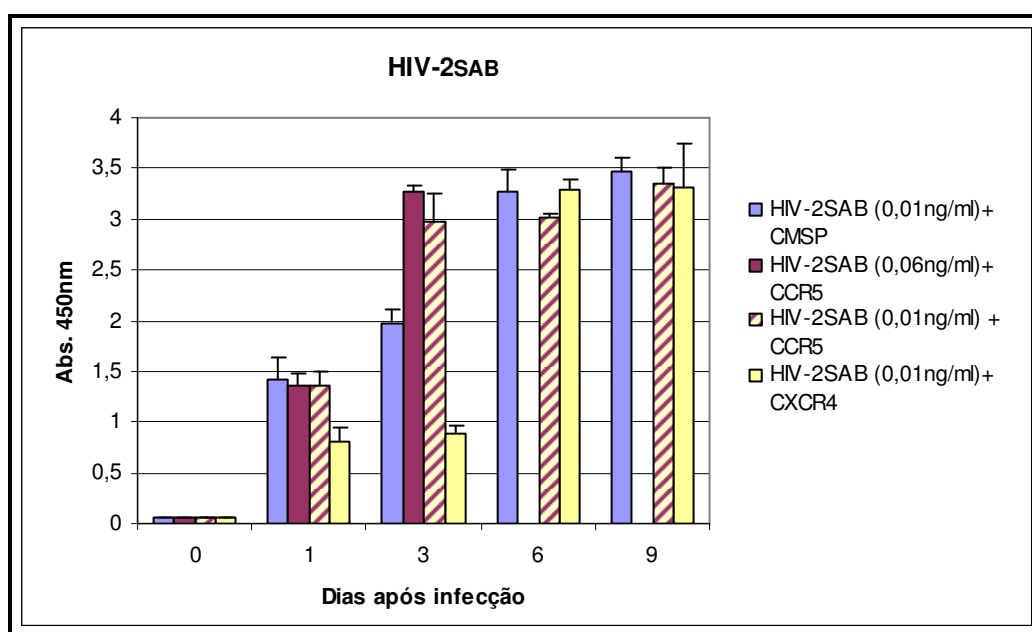
**Figura 16** – Análise da capacidade replicativa do HIV-2<sub>ABG.01</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4.



Em conclusão e tendo em consideração os resultados obtidos (Figuras 12 a 16), observa-se que as barras de produção viral são praticamente sobreponíveis, atingindo um máximo de produção ao fim de 9 dias após inoculação.

Relativamente à estirpe HIV-2<sub>SAB</sub>, verificou-se que utilizando a mesma quantidade de inóculo que nas outras estirpes, observava-se uma extensa morte celular a partir do terceiro dia.

Assim, e de forma a manter o mesmo tempo de experiência, repetiu-se a mesma, normalizando o inóculo dos isolados a uma concentração de 0,01 ng/ml, a fim de diminuir a morte celular. Nestas condições (Figura 17) a produção de partículas virais atingiu o máximo ao fim do nono dia, tendo-se verificado ainda que a estirpe utilizava eficazmente ambos os co-receptores (CCR5 e CXCR4).



**Figura 17** – Análise da capacidade replicativa do HIV-2<sub>SAB</sub> em CMSP e em linha celular GHOST-CCR5, GHOST-CXCR4 expressando CD4.

Conseguiu-se assim, com os resultados obtidos até agora, definir parâmetros, em termos de tempo de experiência (9 dias) e concentração de vírus, de forma evitar a ocorrência de um elevado efeito citopático e permitir a realização e acompanhamento dos ensaios.

#### **4.2.Determinação da susceptibilidade de estirpes VIH-2 à inibição por inibidores do CCR5**

Neste ensaio pretendeu-se estudar a susceptibilidade de estirpes VIH-2 aos antagonistas do CCR5. Face aos resultados anteriormente obtidos e tendo em consideração que a maioria das estirpes em estudo têm tropismo duplo ou misto, utilizou-se como modelo de estudo a linha celular GHOST-CCR5 em vez das CMSP como inicialmente previsto. Além disso, dados já publicados, sugerem que as células GHOST-CCR5 exibem níveis de expressão muito elevados, superiores a qualquer outra linha celular ou CMSP.<sup>81</sup> Tal facto constitui um factor que influencia a eficácia *in vitro* dos antagonistas dos co-receptores.<sup>115, 122</sup> Este modelo tem no entanto a desvantagem de não mimetizar o que acontece *in vivo*, onde as CMSP presentes expressam níveis muito inferiores de receptores celulares (neste caso, CCR5).

Para a análise e comparação da capacidade de quatro inibidores específicos do CCR5 (TAK-779, MVC, mAb2D7 e PF-227153), e uma vez que ainda não existem estudos que demonstrem o efeito destes inibidores no VIH-2, utilizaram-se concentrações de cada um dos inibidores iguais às determinadas como as correspondentes à dose inibitória 50% (IC50) nos ensaios *in vitro* para o HIV-1<sub>BaL</sub>.

Estes resultados foram obtidos em pelo menos duas experiências independentes, analisados e convertidos em percentagem de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = [1 - (A / B) \times 100]$$

Onde:

A= Valor de absorvância obtida pela detecção de antígeno p24 do vírus com o inibidor

B= Valor de absorvância obtida pela detecção de antígeno p24 do vírus sem o inibidor

Usando como controlo o HIV-1<sub>BaL</sub>, constatou-se a existência de níveis de inibição superiores das estirpes VIH-2 quando expostas à mesma concentração dos inibidores.

**Tabela 6** – Taxa de inibição para estirpes VIH-2 e HIV-1<sub>BaL</sub> (quantificação feita ao 9º dia após infecção)

Estirpes	Inibidores	Concentração	Taxa de inibição 9º Dia
HIV-2 <sub>ADC.05</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	57
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	82
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	12
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	92
HIV-2 <sub>MS</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	98
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	87
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	0
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	94
HIV-2 <sub>ALI</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	95
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	96
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	84
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	97
HIV-2 <sub>ABG.01</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	96,4
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	95
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	4
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	86,3
HIV-2 <sub>SAB</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	57
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	60
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	0
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	62
HIV-2 <sub>MMS</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	75
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	70
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	0
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	94
HIV-1 <sub>BaL</sub>	TAK-779	[20nM] <sup>1</sup>	46
	MVC	[0,56nM] <sup>2</sup>	54
	mAb 2D7	[10µg/ml] <sup>3</sup>	54
	PF-227153	[0,56nM] <sup>2</sup>	48

1 → Nakata et al. Antimicrob. Agents Chemother 2008

2 → Dorr et al. Antimicrobial agents and Chemotherapy (2005) 4712-4732

3 → J.M. Azevedo-Pereira et al. Virology 313 (2003) 136-146

Consoante as estirpes VIH-2 em estudo, pode-se observar (Tabela 6) que dos quatro inibidores utilizados, três deles (TAK-779, MVC e PF-227153), tiveram uma eficácia de inibição entre os 60 e 90%, muito superior às observadas para o HIV-1<sub>BaL</sub> (aproximadamente 50%).

Com base nestes resultados observamos ainda que o inibidor TAK-779 se comporta de forma relativamente semelhante para o HIV-1<sub>BaL</sub> (42%), o HIV-2<sub>ADC.05</sub> (57%) e o HIV-2<sub>SAB</sub> (57%). O mesmo não se verifica em relação às outras quatro estirpes (HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>ALL</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub> e HIV-2<sub>MMS</sub>), uma vez que nestas o efeito de inibição é muito superior em comparação com as anteriores, havendo em alguns casos, valores próximos dos 100 % (98%, 95%, 96% e 75%, respectivamente).

Como seria de esperar, as concentrações usadas dos antagonistas MVC e PF-227153 inibiram o HIV-1<sub>BaL</sub> com valores aproximados de 50%. Estes mesmos inibidores quando usados no bloqueio da ligação das estirpes VIH-2 ao co-receptor CCR5, apresentaram sempre taxas superiores de inibição quando comparadas com as taxas para o VIH-1. Concretamente, o valor mínimo obtido foi de 60% para o HIV-2<sub>SAB</sub>, tendo-se obtido como valor máximo, 96% para o HIV-2<sub>ALL</sub>.

Outra das ilações que podemos tirar do conjunto de resultados obtidos, é a inexistência de grandes diferenças relativas à percentagem de inibição do TAK-779, MVC e do PF-227153 para estes isolados do VIH-2.

Este comportamento poderá ser justificado pelo facto de provavelmente, estes inibidores utilizarem os mesmos locais de ligação, como foi demonstrado por Kondru e colegas num estudo de mutagénesis dirigida do CCR5, em que demonstram que os principais aminoácidos envolvidos na ligação do TAK-779 e do MVC ao co-receptor CCR5 eram idênticos.<sup>75</sup>

Relativamente ao PF-227153, não está descrito qual o seu local de ligação ao CCR5 nem quais os principais aminoácidos envolvidos, mas deverá ser idêntico ao MVC, uma vez que esta molécula faz parte da segunda geração do MVC.

Os resultados revelam ainda que os inibidores (TAK-779, MVC e PF-227153) têm uma eficácia muito superior comparados com o mAb 2D7, levando-nos a pressupor que para

a maioria destas estirpes o local de ligação do mAb 2D7 não interfere com os locais necessários à ligação do vírus ao co-receptor CCR5.

Há que salientar ainda o facto deste mesmo inibidor, mAb 2D7, ter demonstrado uma actividade inibitória muito baixa, quase residual, para a maioria das estirpes em estudo (para o HIV-2<sub>SAB</sub>, HIV-2<sub>MS</sub> e HIV-2<sub>MMS</sub>, 0%; HIV-2<sub>ABG.01</sub> 4% e para HIV-2<sub>ADC.05</sub> 12%). Somente o HIV-2<sub>ALI</sub> apresenta uma percentagem de inibição (84%) muito próxima à dos outros inibidores.

Em resumo, estes resultados demonstram que as estirpes VIH-2 aqui estudadas são mais susceptíveis aos antagonistas do CCR5 do que o HIV-1<sub>BaL</sub>.

#### 4.3.Determinação da susceptibilidade de estirpes VIH-2 à inibição por inibidores do CXCR4

Nesta experiência analisou-se a susceptibilidade de estirpes VIH-2 à neutralização por antagonistas do CXCR4, utilizando o mAb 12G5 e o ligando natural, SDF1- $\alpha$ , com uma concentração de 10 $\mu$ g/ml e 5 $\mu$ g/ml respectivamente, já descritas como inibitórias para o HIV-2<sub>SAB</sub>.<sup>6</sup>

**Tabela 7** – Taxa de inibição para o nono dia em estirpes VIH-2 com tropismo duplo

Estirpes	Inibidores	Concentração [ $\mu$ g/ml ] <sup>3</sup>	Taxa de inibição 9º Dia
HIV-2 <sub>ADC.05</sub>	mAb12G5	10	17
	SDF1- $\alpha$	5	0
HIV-2 <sub>MS</sub>	mAb12G5	10	17
	SDF1- $\alpha$	5	80
HIV-2 <sub>SAB</sub>	mAb12G5	10	87
	SDF1- $\alpha$	5	86
HIV-2 <sub>MMS</sub>	mAb12G5	10	34
	SDF1- $\alpha$	5	86

<sup>3</sup>→J.M. Azevedo-Pereira *et al.* Virology 313 (2003) 136-146

Dos resultados apresentados (Tabela 7) constata-se que, o SDF1- $\alpha$  tem uma taxa de inibição elevada (entre 80 e 86%) para quase todas as estirpes em estudo, excepto para o HIV-2<sub>ADC.05</sub>, onde não se verificou qualquer actividade inibitória.

De realçar o facto do anticorpo monoclonal 12G5 ter apresentado uma baixa taxa de inibição para 4 das 5 estirpes testadas, mesmo usando uma concentração de 10 $\mu$ g/ml.

Concretamente, e como se pode observar (Tabela 7) para o HIV-2<sub>MS</sub>, o mAb12G5 tem uma taxa de inibição de apenas 17%, enquanto a taxa de inibição do SDF-1 $\alpha$  foi de 80%. É notório que para o HIV-2<sub>SAB</sub> esta diferença não existe, pois ambos os inibidores apresentam uma actividade inibitória semelhante. Resumindo, verificou-se que o ligando natural CXCR4 tem uma maior capacidade de inibição do que o anticorpo monoclonal anti-CXCR4 para as estirpes de VIH-2 estudadas.

## 5. Discussão

Os inibidores de entrada constituem uma promissora opção terapêutica para doentes infectados com estirpes de VIH resistentes a outros antiretrovirais, tendo já sido identificados uma série desses mesmos inibidores para o VIH-1 com uma boa actividade antiviral *in vitro* e em ensaios clínicos.

De forma a determinar qual o efeito de alguns desses inibidores sobre estirpes VIH-2, utilizou-se neste estudo um conjunto de seis estirpes: HIV-2<sub>SAB</sub>, HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>MMS</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub>, HIV-2<sub>ADC.05</sub> e o HIV-2<sub>ALI</sub>. Estes vírus foram obtidos a partir de doentes em diferentes fases clínicas da infecção e com perfis diferentes na utilização de co-receptores para a sua entrada na célula. Devido ao mecanismo de acção deste tipo de inibidores, é fundamental a caracterização fenotípica dos isolados antes do uso dos antagonistas dos co-receptores de forma a seleccionar os doentes que realmente possam tirar vantagem do uso destes inibidores.

Assim, analisando o fenótipo viral relativamente ao uso dos diferentes co-receptores verificou-se que a maioria das estirpes em estudo (HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>MMS</sub>, HIV-2<sub>ADC.05</sub>, HIV-2<sub>SAB</sub>) são de duplo tropismo (CXCR4 e CCR5), existindo apenas duas estirpes (HIV-2<sub>ALL</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub>) que só utilizam eficazmente o CCR5 como co-receptor.

Tendo em consideração a caracterização fenotípica dos vírus, utilizou-se como modelo, a linha celular GHOST, que se caracteriza por apresentar uma população celular homogénea, expressando CD4 e apenas um dos co-receptores (CCR5 ou CXCR4) ao contrário do que se verifica para as CMSP em que para além da grande heterogeneidade celular, expressam vários co-receptores. Para além deste factor, as células GHOST-CCR5 exibem uma alta densidade de moléculas CCR5, sendo superiores a qualquer outra linha celular ou CMSP.<sup>81</sup>

Em 2002, Reeves e seus colaboradores demonstraram que bastava uma reduzida concentração do TAK-779 para inibir a infecção do VIH-1 nas células (U87/CD4/CCR5) que expressavam níveis de CCR5 mais baixos.<sup>125</sup> Um outro estudo demonstrou que para uma mesma concentração do TAK-779, este foi cerca de 15 vezes mais eficaz sobre células HeLa-CD4/CCR5, perante uma menor expressão de CCR5 (700-2000 CCR5/célula) em comparação com uma maior expressão nesta mesma linha celular HeLa-CD4/CCR5 (10,000-20,000 CCR5/célula).<sup>115</sup> Estes e outros estudos demonstraram existir uma relação linear entre a disponibilidade do CCR5 na membrana celular e a concentração necessária de um antagonista do CCR5, de forma a evitar que este receptor seja utilizado pelo VIH-1.<sup>71, 115, 125</sup>

A infecção duma determinada célula e a eficiência dessa infecção, são determinadas pelas características celulares bem como pela infecciosidade viral. Assim, analisou-se inicialmente a capacidade replicativa de cada estirpe, de forma a determinar qual o dia e



a quantidade de vírus necessária para que ocorresse maior taxa de infecção, sem que houvesse uma elevada morte celular devido à capacidade citopática viral.

Usando inóculos normalizados (0,06 ng/ml) pelo nível de actividade da RT, para as estirpes HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>ALL</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub>, HIV-2<sub>MMS</sub>, e o HIV-2<sub>ADC.05</sub>, foi possível observar uma boa capacidade de infecção destas estirpes ao fim do nono dia.

Aquando da infecção inicial de células GHOST-CCR5 com uma concentração 0,06ng/ml de HIV-2<sub>SAB</sub> verificou-se que devido à elevada capacidade citopática viral, as células apresentavam uma taxa de mortalidade extremamente elevada ao fim do terceiro dia. A fim de se poder seguir o ensaio com o mesmo tempo de experiência (9 dias) mas sem que ocorresse esta massiva destruição celular, optou-se por alterar a concentração do HIV-2<sub>SAB</sub> para 0,01 ng/ml.

Como o objectivo deste trabalho, era determinar a susceptibilidade à neutralização por moléculas inibidoras do CCR5 e do CXCR4, uma vez que ainda não existem estudos que demonstrem o efeito destes inibidores para o VIH-2, começou-se por comparar a capacidade de inibição de quatro inibidores específicos do CCR5 (TAK-779, MVC, mAb2D7 e PF-227153). As concentrações usadas foram as que correspondiam às determinadas nos ensaios *in vitro* para o HIV-1<sub>BaL</sub>, correspondentes à concentração inibitória de 50%.

Relativamente às características dos inibidores, TAK-779, MVC e PF-227153, estes são não-competitivos e funcionam através de efeitos alostéricos, alterando a conformação extracelular do CCR5, após ligação a uma cavidade hidrofóbica do CCR5.<sup>41,148</sup> Já o mAb2D7 liga-se a duas regiões homólogas na segunda ansa extracelular do co-receptor CCR5.<sup>72</sup> Trata-se de um inibidor competitivo, competindo com o local onde o vírus se liga.<sup>79</sup>

Os efeitos dos inibidores TAK-779 sobre o VIH-1 com fenótipo R5 têm sido extensivamente relatados.<sup>9, 41, 102, 133</sup> Num desses estudos verificou-se que o TAK-779

inibiu em 50% a replicação do HIV-1<sub>BaL</sub>, quando presente numa concentração de 20nM.<sup>102</sup> Com base nos valores determinados por Nakata e colaboradores,<sup>102</sup> obteve-se neste ensaio uma percentagem de inibição para o HIV-1<sub>BaL</sub> de 42%, muito semelhante à do referido estudo, tendo-se obtido ainda valores muito semelhantes para duas das estirpes estudadas (HIV-2<sub>ADC.05</sub> e HIV-2<sub>SAB</sub>), ambas com 57% de inibição. O mesmo não se verificou para as outras quatro estirpes, para as quais se obteve valores próximos de 100% de inibição. Estas diferenças de susceptibilidade à inibição sugerem que estas quatro estirpes necessitam, para entrarem nas células, do mesmo local de ligação que o TAK-779 utiliza para se ligar ao CCR5, justificando assim valores tão altos de inibição. Dorr e colaboradores demonstraram que 0,56nM de MVC correspondia à concentração inibitória de 50% (IC50) para o HIV-1<sub>BaL</sub>.<sup>40</sup> Como o PF-227153 é uma molécula em desenvolvimento e idêntica ao MVC, não existindo estudos sobre este inibidor, utilizou-se para os ensaios de inibição a mesma concentração utilizada para o MVC (0,56 nM), tendo ambos inibido 50% da infecção por HIV-1<sub>BaL</sub>.

No caso das estirpes de VIH-2 e quando expostas a estes dois inibidores, verificou-se uma taxa de inibição superior, comparativamente ao HIV-1<sub>BaL</sub>, ou seja, para o HIV-2<sub>SAB</sub> obteve-se um valor de inibição de 60%, tendo todas as outras estirpes valores muito superiores, chegando mesmo a valores próximos dos 100%, como é o caso do HIV-2<sub>ALI</sub> (96%).

Dos resultados obtidos foi possível igualmente verificar que a percentagem de inibição destes três inibidores (TAK-779, MVC e o PF-227153) é semelhante na maioria das estirpes. Este comportamento poderá ser justificado pelo facto de provavelmente utilizarem os mesmos locais de ligação ao co-receptor CCR5 e que um desses locais seja fundamental para a entrada do vírus na célula.

Vários estudos têm demonstrado que as pequenas moléculas antagonistas do CCR5 se ligam ao domínio transmembranar deste receptor,<sup>41, 105, 133, 148</sup> enquanto a gp120 do

VIH-1 se liga primeiro à extremidade N-terminal e de seguida à segunda ansa extracelular do CCR5.<sup>40, 41, 44, 61, 75</sup> Estudos de mutagénese dirigida no gene *ccr5* revelaram ainda quais os principais aminoácidos necessários para que estes antagonistas possam bloquear a ligação do VIH ao CCR5.<sup>4, 75, 105, 133, 148</sup> Um destes estudos realizado por Kondru e colaboradores demonstrou que os principais aminoácidos envolvidos na interacção dos inibidores (TAK-779 e MVC) ao co-receptor CCR5 são idênticos: E283 na TM7, Y251 na TM6, I198 na TM5, Y108 na TM3 e W86 na TM2 (Figura 10). Nesse mesmo estudo verificou-se ainda uma forte interacção do TAK-779 com o Y108 na TM3, do W86 na TM2 e uma fraca interacção com o E283 na TM7, podendo isto ser explicado pela diferente estrutura deste inibidor comparativamente ao MVC.<sup>75</sup>

No presente trabalho não se verificou qualquer interferência no efeito inibitório de cada um dos dois inibidores (MVC e TAK-779) apesar das suas diferenças estruturais, dado que ambos tinham uma percentagem de inibição semelhante para cada estirpe do VIH-2, conforme demonstrado anteriormente. Sugerindo que ambos actuam da mesma forma e que todas as estirpes VIH-2 estudadas necessitam dos locais por eles ocupados para se ligarem ao co-receptor CCR5.

Face aos resultados obtidos na análise comparativa dos antagonistas do CCR5, verificou-se que três dos quatro inibidores (TAK-779, MVC e o PF-227153) apresentaram uma percentagem de inibição elevada nas seis estirpes (valores superiores a 60%). Estes inibidores demonstraram ainda uma eficácia de neutralização muito superior ao mAb2D7, revelando que pequenas alterações na segunda ansa extracelular podem resultar em diferenças significativas na sensibilidade a um determinado inibidor. Verificou-se ainda neste estudo que o mAb2D7 não demonstrou qualquer actividade inibitória para as estirpes HIV-2<sub>SAB</sub>, HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>MMS</sub> e uma taxa de inibição quase residual para o HIV-2<sub>ABG.01</sub> (4%) e o HIV-2<sub>ADC.05</sub> (12%). No entanto, há que salientar a

elevada capacidade de neutralização evidenciada para a estirpe HIV-2<sub>ALI</sub>, muito próxima à dos outros inibidores.

Estes resultados sugerem que o HIV-2<sub>ALI</sub> necessita da estrutura original da segunda ansa extracelular (ECL2) para entrar na célula, uma vez que na presença destes inibidores a ECL2 do co-receptor CCR5 é modificada, independentemente da forma como essa alteração da conformação é realizada por cada um dos inibidores do CCR5.

Em resumo, a segunda ansa extracelular parece ter um papel crucial na ligação do HIV-2<sub>ALI</sub> ao co-receptor, uma vez que este é facilmente neutralizado por todos os inibidores estudados.

Relativamente as outras estirpes (HIV-2<sub>SAB</sub>, HIV-2<sub>MS</sub>, HIV-2<sub>MMS</sub>, HIV-2<sub>ABG.01</sub> e o HIV-2<sub>ADC.05</sub>), é provável que para além da ECL2 (o mAb2D7 liga-se apenas neste local), existam outros locais de ligação, utilizados pelo TAK-779, MVC e o PF-227153, que sejam mais importantes para a ligação do vírus ao CCR5, uma vez que todos eles, são facilmente neutralizados por todos estes inibidores.

Neste trabalho, determinou-se ainda a susceptibilidade à inibição por inibidores do CXCR4, onde se utilizou uma concentração de 5µg/ml e 10µg/ml para o SDF1-α e para o mAb 12G5 respectivamente, já descritos como inibitórios para o HIV-2<sub>SAB</sub>.<sup>6</sup>

Os resultados do presente trabalho confirmam o já descrito e acrescentam que esta capacidade de inibição do SDF1-α também se verifica para quase todas as estirpes do nosso estudo, sendo os valores próximos dos 86%. No entanto, é importante salientar que o inibidor mAb12G5 apresentou uma baixa taxa de inibição para 4 das 5 estirpes testadas.

Estes dados poderão sugerir que para o HIV-2<sub>SAB</sub>, todos os locais de ligação envolvidos na interligação destes inibidores ao co-receptor CXCR4 são importantes, uma vez que foi a única estirpe que foi realmente inibida por todos os inibidores.

Em resumo, com as experiências descritas neste trabalho, foi possível concluir que para as estirpes VIH-2, o SDF1- $\alpha$  tem um maior efeito de inibição em comparação com o mAb12G5, sendo estas estirpes mais susceptíveis aos antagonistas do CCR5 (TAK-779, MVC e PF-227153) do que o HIV-1<sub>BaL</sub>. Em relação ao mAb2D7, este não teve qualquer actividade inibitória na maioria das estirpes VIH-2, tendo apenas apresentado uma actividade inibitória semelhante aos outros inibidores para a estirpe HIV-2<sub>ALI</sub>.

Considerando a ausência de dados relativamente ao efeito destes inibidores sobre o VIH-2, estes resultados apontam para um possível benefício da inclusão destes inibidores nos esquemas terapêuticos de tratamento das infecções pelo VIH-2, sendo no entanto necessário a realização de mais estudos para clarificar a eficácia destes inibidores, nomeadamente *in vivo*.

## 6. Conclusão e Perspectivas

A partir do estudo de fenotipagem realizado, foi possível verificar que das seis estirpes estudadas, quatro são de duplo tropismo (utilizam ambos os co-receptores CXCR4 e o CCR5) e as restantes utilizam somente o CCR5. Devido a estas características, foi escolhido como modelo para os estudos de susceptibilidade à neutralização por moléculas inibidoras do CCR5 e do CXCR4 para as seis estirpes VIH-2 e para o controlo HIV-1<sub>BaL</sub> a linha celular GHOST expressando CD4 e um dos diferentes co-receptores (CCR5 ou CXCR4).

Após a realização dos ensaios de inibição, os resultados demonstraram que as estirpes utilizadas são mais susceptíveis aos antagonistas do CCR5 do que o HIV-1<sub>BaL</sub> e que apenas uma estirpe (HIV-2<sub>ALI</sub>) apresenta uma percentagem de inibição elevada e semelhante em relação a todos os inibidores testados.

Relativamente aos inibidores do CXCR4, conclui-se que o SDF1- $\alpha$  tem uma maior capacidade de inibição para as estirpes VIH-2 estudadas quando comparado com o mAb12G5.

Este trabalho vem demonstrar que os inibidores TAK-779, PF-227153 e o SDF-1 $\alpha$  são potentes antagonistas do CCR5 (os dois primeiros) e do CXCR4 (o último) para o VIH-2, à semelhança do que já acontece para o VIH-1.

Por fim, os resultados obtidos sugerem que o uso do MVC poderá ser útil em pacientes infectados com estirpes R5 do VIH-2, apresentando-se assim como uma hipótese terapêutica na resolução ou diminuição desta infecção que se apresenta como um problema real no contexto da infecção pelo VIH. No entanto, há que ter presente que as estirpes do VIH-2 têm como característica a elevada promiscuidade em termos de utilização de co-receptores, sendo imperativo a necessidade de um rastreio prévio de forma a se verificar a existência de estirpes apenas com tropismo R5 (previsivelmente raras).

Futuramente, proceder-se-á à determinação da IC50 dos inibidores para as estirpes VIH-2, e a verificação de resistências com base nos ensaios de inibição. As amostras que apresentarem evidência fenotípica de resistência aos inibidores de entrada serão individualmente estudadas, sendo depois analisadas por sequenciação do gene *env* (gp160), seguindo-se por fim a identificação das mutações responsáveis por essa resistência aos inibidores.

Seria também importante perceber qual a razão da discrepância dos valores entre a detecção do antígeno e a transcriptase reversa, sendo uma das hipóteses, a possibilidade de existirem componentes nos sobrenadantes celulares que interfiram na análise da RT. Estes poderão bloquear a enzima da RT, degradar o “template” de ARN ou o substrato BrdUTP, e/ou ainda a cadeia sintetizada pelo poly-BrdU.

Os resultados obtidos neste trabalho e a sua futura consecução, para além de melhorarem o conhecimento das interacções entre o VIH-2 e a célula alvo, poderão também contribuir para o desenvolvimento de terapêuticas mais concretas e simplificadas em doentes infectados pelo VIH-2, principalmente para aqueles cuja terapêutica actual não tenha qualquer efeito.



# Referências Bibliográficas

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. and Pober. J. S. 2000. Cellular and Molecular Immunology. 4ª Ed, W.B. Saunders Company, Philadelphia.
2. Agrawal, L., Lu, X., Qingwen, J., VanHorn-Ali, Z., Nicolescu, V., McDermott, D., Murphy, P. M. and Alkhatib, G. 2004. Role for CCR5 $\Delta$ 32 protein in resistance to R5, R5X4, and X4 human immunodeficiency virus type 1 in primary CD4<sup>+</sup> cells. *Journal of Virology*. 78:2277-2287.
3. Andersson, S. 2001. HIV-2 and the Immune Response. *AIDS Reviews*. 3:11-23.
4. Andersson, S., Norrgren, H., da Silva, Z., Biague, A., Bamba, S., Kwok, S., Christopherson, C., Biberfeld, G. and Albert, J. 2000. Plasma viral load in HIV-1 and HIV-2 singly and dually infected individuals in Guinea-Bissau, West Africa: significantly lower plasma virus set point in HIV-2 infection than in HIV-1 infection. *Archives of Internal Medicine*. 160: 3286-3293.
5. Ariyoshi, K., Berry, N., Wilkins, A., Ricard, D., Aaby, P., Naucner, A., Ngom, P.T., Jobe, O., Jaffar, S., Dias, F., Tedder, R. S. and Whittle, H. 1996. A community-based of human immunodeficiency virus type 2 provirus load in rural village in West Africa. *Journal of Infectious Diseases*. 173: 254-248.
6. Azevedo Pereira, J. M., Santos-Costa, Q., Mansinho, K., and Moniz-Pereira, J. 2003. Identification and characterization of HIV-2 strains obtained from

- asymptomatic patients that do not use CCR5 or CXCR4 coreceptors. *Virology* 313:136-146.
7. Azevedo Pereira, J. M., Santos-Costa, Q., Taveira, N., Veríssimo, F. and Moniz-Pereira, J. 2003. Construction and characterization of CD4-independent infectious recombinant HIV-2 molecular clones. *Virus Research*. 97:159-163.
  8. Azevedo-Pereira, J. M., Santos-Costa, Q. and Moniz-Pereira, J. 2005. HIV-2 infection and chemokine receptors usage - clues to reduced virulence of HIV-2. *Current HIV Research*. 3:3-16.
  9. Baba, M., Nishimura, O., Kanzaki, N., Okamoto, M., Sawada, H., Iizawa, Y., Shiraishi, M., Aramaki, Y., Okonogi, K., Ogawa, Y., Meguro, K. and Fujino, M. 1999. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 5698–703.
  10. Barré-Sinoussi, F., Chermann, J. C., Rey, F., Nugeyre, M. T., Chamaret, S., Gruest, J., Dautet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., Rozenbaum, W., and Montagnier, L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868-871.
  11. Berger, E. A., Doms, R.W., Fenyo, E. M., Korger, B.T., Littman, D.R., Moore, J.P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski, J. and Weiss, R. A. 1998. A new classification for HIV-1. *Nature*. 391:240.

12. Berger, E. A., Murphy, P.M. and Farber, J.M. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptores: role in viral entry, tropism, and disease. *Annual Review of Immunology*. 17:657-700.
13. Berry, N., Ariyoshi, K., Jaffar, S., Sabally, S., Corrah, T., Tedder, R. and Whittle, H. 1998. Low peripheral blood viral HIV-2 RNA in individuals with high CD4 percentage differentiates HIV-2 from HIV-1 infection. *Journal of Human Virology*. 1:457-468.
14. Berry, N., Jaffar, S., Schim van der Loeff, M., Ariyoshi, K., Harding, E., N’Gom, P.T., Dias, F., Wilkins, A., Ricard, D., Aaby, P., Teddr, R. and Whittle, H. 2002. Low level viremia and high CD4 % predict normal survival in a cohort of HIV type-2-infected villagers. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 18:1167-1173.
15. Bhattacharya, J., Peters, P. J. and Clapham, P.R. 2003. CD4-independent infection of HIV and SIV: implications for envelope conformation and cell tropism in vivo. *AIDS*. 17 (suppl 4): S35-S43.
16. Blaak, H., van der Ende, M.E., Boers, P.H., Schuitemaker, H. and Osterhaus, A.D. 2006. In vitro replication capacity of HIV-2 variants from long-term aviremic individuals. *Virology*. 353: 144-154.
17. Blaak, H., Boers, P. H. M., Gruters, R. A, Schuitemaker, H., Van Der Ende, M. E. and. Osterhaus, A. D. M. E. 2005. CCR5, GPR15, and CXCR6 are major

- coreceptors of human immunodeficiency virus type 2 variants isolated from individuals with and without plasma viremia. *Journal of Virology*. 79:1686-1700.
18. Bomsel, M. and David, V. 2002. Mucosal gatekeepers: selecting HIV viruses for early infection. *Nature Medicine*. 8:114-116.
19. Brennan, R. O. and Durack, D.T. 1981. Gay compromise syndrome. *Lancet* 2:1338-1339.
20. Briz, V., Poveda, E. and Soriano, V. 2006. HIV entry inhibitors: mechanisms of action and resistance pathways. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 57:619-627.
21. Bunnik, E. M., Quakkelaar, E.D., van Nuenen, A.C., Boeser-Nunnink, B. and Schuitemaker, H. 2007. Increased Neutralization Sensitivity of Recently Emerged CXCR4 – Using Human Immunodeficiency Virus Type 1 Strains Compared to Coexisting CCR5-Using Variants from the Same Patient. *Journal of Virology*. 81:525-531.
22. CDC – Centers for Disease Control and prevention.  
[http://www.aidsctc.org/aidsctc?page=cm-105\\_disease#S6X](http://www.aidsctc.org/aidsctc?page=cm-105_disease#S6X) (acedido em Maio de 2009).

23. Cecilia, D., Kulkarni, S. S., Tripathy, S. P., Gangakhedkar, R. R., Paranjape, R. S., and Gadkari, D. A. 2000. Absence of coreceptor switch with disease progression in human immunodeficiency virus infections in India. *Virology* 271:253-258.
24. Chakrabarti, L. A. 2004. The paradox of simian immunodeficiency virus infection in sooty mangabeys: active viral replication without disease progression. *Frontiers in Bioscience*. 9:521-539.
25. Chan, D. C. and Kim, P. S. 1998. HIV entry and its inhibition. *Cell*. 93: 681-684.
26. Clapham, P. R., Reeves, J. D., Simmons, G., Dejucq, N., Hibbitts, S. and McKnight, A. 1999. HIV coreceptors, cell tropism and inhibition by chemokine receptor ligands. *Molecular Membrane Biology*. 16:49-55.
27. Clapham, P. R. and McKnight, A. 2002. Cell surface receptors, virus entry and tropism of primate lentiviruses. *Journal of General Virology*. 83:1809-1829.
28. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M-A., Santos-Ferreira, M.O., Laurent, A.G., Dauguet, C., Katlana, C., Rouzioux, C., Klatzmann, D., Champalimaud, J.L. and Montagnier, L. 1986. Isolation of a New Human Retrovirus from West African Patients with AIDS. *Science*. 233:343-346.
29. Clavel, F., Brun-Vezinet, F., Guetard, D., Chamaret, S., Laurent, A., Rouzioux, C., Rey, M., Katlama C., Rey, F. and Champalimaud, J. L. 1986. [LAV type II: a

- second retrovirus associated with AIDS in West Africa]. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III.* 302:485-488.
30. Clavel, F., Mansinho, M., Chamaret, S., Guetard, D., Favier, V., Nina, J., Santos-Ferreira, M.O., Champalimaud, J.L. and Monmtagnier, L. 1987 Human immunodeficiency virus type 2 infection associated with AIDS in West Africa. *New England Journal of Medicine.* 316:1180-1185.
31. Clevestig, P., Pramanik, L., Leitner, T. and Ehrnst, A. 2006. CCR5 use by human immunodeficiency virus type 1 is associated closely with the gp120 V3 loop N-linked glycosylation site. *Journal of General Virology.* 87:607-612.
32. Coffin, J. M. 1999. Molecular biology of HIV. *In* Crandall, K. A. (ed.). *The evolution of HIV.* The Johns Hopkins University Press. London. Pp. 3-40.
33. Cooley, L.A. and Lewin, S.R. 2003. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *Journal of Clinical Virology.* 26:121-132.
34. Cormier, E. G. and Dragic, T. 2002. The crown and stem of the V3 loop distinct roles in human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein interactions with the CCR5 coreceptor. *Journal of Virology.* 75:8953-8957.
35. CVEDT, Coordenação Nacional para a Infecção HIV/SIDA. A situação em Portugal da SIDA em 31 de Dezembro de 2008. [http://www.aidsportugal.com/recursos/HIV-SIDA\\_Dezembro\\_de\\_2008.pdf](http://www.aidsportugal.com/recursos/HIV-SIDA_Dezembro_de_2008.pdf) (acedido em Maio de 2009).

36. Dalgleish, A.G., Beverley, P.C.L., Clapham, P.R., Crawford, D.H., Greaves, M.F. and Weiss, R.A. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovírus. *Nature*.12:763-767.
37. Damond, F., Apetrei, C., Robertson, D. L., Souquiere, S., Lepretre, A., Matheron, S., Plantier, J. C., Brun-Vezinet, F. and Simon, F. 2001. Variability of human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) infecting patients living in France. *Virology*. 280:19-30.
38. Damond, F., Worobey, M., Campa, P., Farfara, I., Colin, G., Matheron, S., Brun-Vezinet, F., Robertson, D. L. and Simon, F. 2004. Identification of a highly divergent HIV type 2 and proposal for a change in HIV type 2 classification. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 20:666-672.
39. Doms, R.W. 2004. Unwelcome Guests With Master Keys: How HIV Enters Cells and How It Can Be Stopped. International AIDS Society-USA. *Topics in HIV Medicine*. 12:100-103.
40. Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., Webster, R., Armour, D., Price, D., Stammen, B., Wood, A. and Perros, M. 2005. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 49:4721-4732.

41. Dragic T, Trkola, A., Thompson, D.A., Cormier, E.G., Kajumo, F.A., Maxwell, E., Lin, S.W., Ying, W., Smith, S.O., Sakmar, T.P. and Moore, J.P. 2000. A binding pocket for a small molecule inhibitor of HIV-1 entry within the transmembrane helices of CCR5. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:5639-44.
42. Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G.P., Martin, S.R., Huang, Y., Nagashima, K.A., Cayanan, C., Maddon, P.J., Koup, R.A., Moore, J.P. and Paxton, W.A. 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR5. *Nature*.381:667-673.
43. D'Souza, M.P. and Harden, V.A. 1996. Chemokines and HIV-1 second receptors, *Nature Medicine*. 2: 1293-1300.
44. Esté, J.A., and Telenti, A. 2007. HIV entry inhibitors. *Lancet* 370:81-88.
45. Fauci, A.S., Pantaleo, G., Stanley, S. and Weissman, D. 1996. Immunopathogenic Mechanisms of HIV Infection. *Annals of Internal Medicine*. 124: 654-663.
46. FDA. Consumer update. August 2007. U. S. Food and Drugs Administration. Rockville, MD. United States of America. <http://www.fda.gov/consumer/updates/hivdrug080707.html>. (acedido em Maio de 2009).
47. Feinberg, M.B., Baltimore, D. and Frankel, A.D. 1991. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on



- transcriptional elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 88: 4045-4049.
48. Freed, E. O. and Martin, M.A. 2001. HIVs and their replication. *In* Knipe, D. M. and Howley, P. M. (ed.) *Fields Virology* Vol. 2. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa. pp. 1971-2042.
49. Gallo, R. C., and Montagnier L. 2002. Historical essay. A history of HIV discovery. *Science*. 298:1727-1728.
50. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D. L., Chen, Y. L., Rodenburg, C. M., Michael, S. F., Cummins, L. B., Arthur, L. O., Peeters, M., Shaw, G. M., Sharp, P. M. and Hahn, B. H. 1999. Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes*. *Nature*. 397:436-441.
51. Gomes, P., Abecasis, A., Almeida, M., Camacho, R. and Mansinho K. 2003. Transmission of HIV-2. *Lancet Infectious Diseases* 3:683-684.
52. Gomes, P., Taveira, N. C., Pereira, J. M., Antunes, F., Ferreira, M. O. S. and Lourenço, M. H. 1999. Quantitation of human immunodeficiency virus type 2 DNA in peripheral blood mononuclear cells by using a quantitative-competitive PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 37:453-456.
53. Gonçalves, J. and Santa-Marta, M. 2004. HIV-1 Vif and APOBEC3G: Multiple roads to one goal. *Retrovirology*. 1:28.

54. Greene, W. C., and Peterlin, B.M. 2002. Charting HIV's remarkable voyage through the cell: science as a passport to future therapy. *Nature Medicine*. 8:673-680.
55. Hahn, B. H., Shaw, G. M., De Cock, K. M. and Sharp, P. M. 2000. AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287:607-614.
56. Hardy, D., Reynes, J., Konourina, I., Wheeler, D., Moreno, S., van der Ryst, E., Towner, W., Horban, A., Mayer, H. and Goodrich, J. 2008. Efficacy and safety of maraviroc plus optimized background therapy in treatment-experienced patients infected with CCR5-tropic HIV-1:48 week combined analysis of the MOTIVATE Studies. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Boston, EUA, 3-6 February Poster 792.
57. Hattori N, Michaels, F., Fargnoli, K., Marcon, L., Gallo, R.C. and Franchini, G. 1990. The human immunodeficiency virus type 2 vpr gene is essential for productive infection of human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:8080–8084.
58. Hladik, F., Liu, H., Spielmon, E., Livingston-Rosanoff, D. Wilson S., Sakchalathorn, P., Hwangbo, Y., Greene, B., Zhu, T. and McElrath, M. J. 2005. Combined effect of CCR5- Delta 32 heterozygosity and the CCR5 promoter polymorphism-2459 A/G on CCR5 expression and resistance to human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Journal of Virology*. 79:11677-11684.

59. Hoffman, T. L., La Branche, C.C., Zhang, W., Canziani, G., Robinson, J., Chaiken, I., Hoxie, J.A. and Doms, R.W. 1999. Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:6359-6364.
60. Hoffmann, C., Rockstroh, J.K. and Kamps, B.S. HIV Medicine 2007. 2007. Flying Publisher. <http://www.hivmedicine.com/hivmedicine2007.pdf>. (acedido em Março de 2008)
61. Huang, C. C., Tang, M., Zhang, M. Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R. L., Dimitrov, D. S., Korber B., Sodroski, J., Wilson, I. A., Wyatt, R. and Kwong, P. D. 2005. Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science*. 310:1025-1028.
62. Huang, C. C., Lam, S. N., Acharya, P., Tang, M., Xiang, S. H., Hussan, S. S. U., Stanfield, R. L., Robinson, J., Sodroski J., Wilson, I. A., Wyatt, R., Bewley, C. A. and Kwong, P. D. 2007. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science*. 317:1930-1934.
63. ICTVdB. - The Universal Virus Database, version 3. 2006. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB> (acedido em Março de 2008).
64. Isaka, Y., Sato, A., Miki, S., Kawauchi, S., Sakaida, H., Hori, T., Uchiyama, T., Adachi, A., Hayami, M., Fujiwara, T. and Yoshie, O. 1999. Small amino acid

- changes in the V3 loop of human immunodeficiency virus type 2 determines the coreceptor usage for CXCR4 and CCR5. *Virology*.264:237-243.
65. Jameson, J. L. 1998. Principles of Molecular Medicine. Humana Press Inc. Totowa. New Jersey.
66. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO). AIDS epidemic update: 2007. <http://www.youandaids.org/Infocus/epidemic%20update%202007.pdf>. (Acedido em Março 2008).
67. Jones, J., Taylor, B., Wilkin, T. J. and Hammer, S. M. 2007. Advances in antiretroviral therapy. *Topics in HIV Medicine*. 15:48-82.
68. Kandathil, A. J., Ramalingam, S., Kannangai, R., David, S. and Sridharan, G. 2005. Molecular epidemiology of HIV. *Indian Journal of Medical Research*. 121:333-344.
69. Kanki, P. J. 1999. Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2). *AIDS Reviews*. 1:101-108.
70. Kappes J.C., Conway, J.A., Lee, S.W., Shaw, G. M. and Hahn, B.H. 1991. Human immunodeficiency virus type 2 vpx protein augments viral infectivity. *Virology*. 184: 197-209.

71. Ketas, T. J., Kuhmann, E. S., Palmer, A., Zurita J., He, W., Ahuja, S. K., Klasse, P. J. and Moore, J. P. 2007. Cell surface expression of CCR5 and other host factors influence the inhibition of HIV-1 infection of human lymphocytes by CCR5 ligands. *Virology*. 364: 281–290.
72. Khurana, S., Kennedy, M., King, L. R. and Golding, H. 2005. Identification of a Linear Peptide Recognized by Monoclonal Antibody 2D7 Capable of Generating CCR5-Specific Antibodies with Human Immunodeficiency Virus-Neutralizing Activity. *Journal of Virology*. 79: 6791-6800.
73. Kilby J., and Eron, J. 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *New England Journal of Medicine*. 348:2228-38.
74. Klatzmann, D., Barre-Sinoussi, F., Nugeyre, M.T., Dauguet, C., Vilmer, E., Griscelli, C., Brun-Vezinet, F., Rouzioux C., Gluckman, J.C., Chermann, J.C. and Montagnier, L. 1984 Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science*. 225:59.
75. Kondru, R., Zhang, J., Ji, C., Mirzadegan, T., Rotstein, D., Sankuratri S. and Dioszegi, M. 2008. "Molecular interactions of CCR5 with major classes of small-molecule anti-HIV CCR5 antagonists". *Molecular Pharmacology*. 73: 789–800.
76. Koning, F. A., van Rij, R.P. and Schuitemarker. 2002. Biological and molecular aspects of HIV-1 coreceptor usage. *In* Kuiken, C., Foley, B., Freed, E., hahn, B., Korber, B., Marx, P. A., McCutchan, F., Mellors, J. W. and Wolinsky, S. (ed.).

- HIV Sequence Compendium 2002. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM. Pp. 24-42.
77. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., Hahn, B.H., Wolinsky, S. and Bhattacharya, T. 2000. Timing the Ancestor of the HIV-1 Pandemic Strains. *Science*. 288: 1789-1796.
78. Kuhmann, S. E. and Hartley O. 2008. Targeting chemokine receptors in HIV: A status report. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 48:425-461.
79. Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J. and Hendrickson W. A. 1998. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 393: 648-659.
80. Lawson, V. A., Oelrichs, R., Guillon, C., Imrie, A. A., Cooper, D. A., Deacon, N. J. and McPhee, D. A. 2002. Adaptive changes after human immunodeficiency virus type 1 transmission. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 18:545-556.
81. Lee, B., Sharron, M., Montaner, L.J., Weissman, D. and Doms, R.W. 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocytes subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96: 5215-5220.

82. Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M. and Vandamme, A.M. 2003. Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:6588-6592.
83. Levy, J. 1998. *HIV and pathogenesis of AIDS*. 2nd edition. ASM Press.
84. Lin, G., Bertolotti-Ciarlet, A., Haggarty, B., Romano, J., Nolan, K.M., Leslie, G.J., Jordan, A.P., Huang, C.C., Kwong, P.D., Doms, R.W. and Hoxie, J.A. 2007. Replication-competent variants of human immunodeficiency virus type 2 lacking the V3 loop exhibit resistance to chemokine receptor antagonists. *Journal of Virology*. 81:9956-9966.
85. Little, S. J. and Perrin, L. 2000. Management of Acute and early HIV-1 Infection. *AIDS Reviews*. 2:136-142.
86. Littman, D. R. 1998. Chemokine receptors: keys to AIDS pathogenesis? *Cell* 93:677-680.
87. Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J.H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M. and Clark-Lewis I. 2001. The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *Journal of Biological Chemistry*. 276:2986-2991.

88. Lu, M., Blacklow, S. and Kim, P.A. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nature Structural & Molecular Biology*. 2:1075-82.
89. Marcon, L., Michaels, F., Hattori, N., Fagnoli, K., Gallo, R.C. and Franchini, G. 1991. Dispensable role of the human immunodeficiency virus type 2 Vpx protein in viral replication. *Journal Virology*. 65: 3938-42.
90. Markovic I. 2006. Advances in HIV-1 entry inhibitors: strategies to interfere with receptor and coreceptor engagement. *Current Pharmaceutical Design* 12:1105-19.
91. Markovitz, D. M. 1993. Infection with the human immunodeficiency virus type 2. *Annals of Internal Medicine*. 118:211-218.
92. Marlink, R., Kanki, P., Thior, I., Travers, K., Eisen, G., Siby, T., Traore, I., Hsieh, C. C., Dia, M. C., Gueye, E., Hellinger, J., Gueyendia, A., Sankale, J. L., Ndoye, I., Mboup, S. and Essex, M. 1994. Reduced Rate of Disease Development after Hiv-2 Infection as Compared to Hiv-1. *Science*. 265:1587-1590.
93. McFadyen, L., Jacqmin, P., Wade, J. and Weatherly, B. 2008. Maraviroc exposure-efficacy (50copies/mL) analysis in HIV-1 infected treatment-naïve subjects-ITT population (MERIT study). XVII International AIDS Conference, México, 3-8 Agost Abstract TUPE0053.



94. Mcknight, A., Dittmar, M. T., Moniz-Periera, J., Ariyoshi, K., Reeves, J. D., Hibbitts, S., Whitby, D., Aarons, E., Proudfoot A. E. I., Whittle, H. and Clapham P. R. 1998. A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *Journal of Virology*. 72:4065-4071.
95. McNicholl, J.M., Smith, D.H. and Hodge, T. 1997. Host genes and HIV: The role of the chemokine receptor gene CCR5 and its allele ( $\Delta 32$  CCR5). *Emerging Infectious Diseases*. 3: 261-271.
96. Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert D. M. and Cohen, F. S. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *Journal of Cell Biology*. 151:413-423.
97. Montagnier, L. 2002. Historial essay. Discovering the cause of AIDS. *Science* 298:1726.
98. Morner, A., Bjorndal, A., Leandersson, A. C., Albert, J., Bjorling, E. and Jansson, M. 2002. CCR5 or CXCR4 is required for efficient infection of peripheral blood mononuclear cells by promiscuous human immunodeficiency virus type 2 primary isolates. *AIDS Research Human Retroviruses*. 18:193-200.
99. Mota-Miranda, A., Gomes, H., Lima-Alves, C., Araújo, F., Cunha-Ribeiro, L. M. and Taveira, N. 2001. Perinatally acquired HIV-2 infection diagnosed at 15 and 24 years of age. *AIDS*. 15:2460-2461.

100. Mota-Miranda, A., Gomes, H., Serrão, R. and Araújo, F. 2004. Transmission of HIV-2: another perspective. *Lancet Infectious Diseases*. 4:265-266.
101. Murphy, P.M. 1996. Chemokine receptors: structure, function, and role in microbial pathogenesis. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 7:47–64.
102. Nakata, H., Steinberg, S. M., Koh, Y., Maeda, K., Takaoka, Y., Tamamura, H., Fujii, N. and Mitsuya H. 2008. Potent Synergistic Anti-Human Immunodeficiency Virus (HIV) Effects Using Combinations of the CCR5 Inhibitor Atraviroc with Other Anti-HIV Drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52: 2111–2119.
103. Neelanjana Ray. 2008. Maraviroc in the treatment of Hiv infection. *Drug Design, Development and Therapy*. 2: 151-161.
104. Neves, S.R., Ram, P.T. and Iyengar R. 2002. G Protein Pathways. *Science*. 296:1636-1639.
105. Nishikawa, M., Takashima, K., Nishi, T., Furuta, R.A., Kanzaki, N., Yamamoto, Y. and Fujisawa J. 2005. Analysis of binding sites for the new small-molecule CCR5 antagonist TAK-220 on human CCR5. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:4708-4715.

106. O'Brien, S.J. and Moore, J.P. 2000. The effect of genetic variation in chemokines and their receptors on HIV transmission and progression to AIDS. *Immunological Reviews*. 177:99–111.
107. O'Donovan, D., Ariyoshi, K., Milligan, P., Ota, M., Yamuah, L., Sarge-Njie, R. and Whittle H. 2000. Maternal plasma viral RNA levels determine markerd differences in mother-to-child transmission rates of HIV-1 and HIV-2 in the Gambia. *AIDS*. 14: 441-448.
108. Owen, S. M., Ellenberger, D., Rayfield, M., Wiktor, S., Michel, P., Grieco, M. H., Gao, F., Hahn, B. H. and Lal, R. B. 1998. Genetically divergent strains of human immunodeficiency virus type 2 use multiple coreceptors for viral entry. *Journal Virology*. 72:5425-5432.
109. Palella, F.J., Delaney, Jr, K.M., Moorman, A.C., Loveless, M.O., Fuhrer J. M.D., Satten, G.A., Aschman, D.J. and Holmberg S.D. 1998. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. *New England Journal of Medicine*. 338:853-860.
110. Pantophlet, R. and D. R. Burton. 2006. GP120: target for neutralizing HIV-1 antibodies. *Annual Review of Immunology*. 24:739-769.
111. Park, I. W. and J. Sodroski. 1995. Functional analysis of the vpx, vpr, and nef genes of simian immunodeficiency virus. *Journal of acquired immune deficiency syndromes and human retrovirology*. 8: 335–344.

112. Pastore, C., Nedellec, R., Ramos, A., Pontow, S., Ratner, L. and Mosier, D.E. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching: V1/V2 gain-of-fitness mutations compensate for V3 loss-of-fitness mutations. *Journal Virology*. 80: 750-758.
113. Paterlini, M.G. 2002. Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: Implications for ligand binding and selectivity. *Biophysical Journal*. 83:3012-3031.
114. Peeters, M., Toure-Kane, C. and Nkengasong, J. N. 2003. Genetic diversity of HIV in Africa: impact on diagnosis, treatment, vaccine development and trials. *AIDS*. 17:2547-2560.
115. Platt, E.J., Durnin, J.P. and Kabat, D. 2005. Kinetic factors control efficiencies of cell entry, efficacies of entry inhibitors, and mechanisms of adaptation of human immunodeficiency virus. *Journal of Virology*. 79: 4347–4356.
116. Polzer, S., Dittmar, M.T., Schmitz, H. and Schreiber, M. 2002. The N-Linked glycan g15 within the V3 loop of the HIV-1 external glycoprotein gp120 affects coreceptor usage, cellular tropism, and neutralization. *Virology*. 304:70-80.
117. Popper, S. J., Sarr, A.D., Gueye-Ndiaye, A., Mboup S., Essex, M.E. and Kanki P.J. 2000. Low plasma human immunodeficiency virus type 2 viral load is independent of proviral load: low virus production in vivo. *Journal of Virology*. 74:1554-1557.

118. Poulsen A. G., Aaby, P., Larsen, O., Jesen, H., Naucner, A., Lisse, I.M., Christiansen, C.B., Dias, F. and Melbye, M. 1997. 9-year HIV-2-associated mortality in an urban community in Bissau, West Africa. *Lancet*. 349:911-914.
119. Poveda, E., Briz, V. and Soriano, V. 2005. Enfuvirtide, the first fusion inhibitor to treat HIV infection. *AIDS Reviews* 7:139–147.
120. Pugach, P., Marozsan, A.J., Ketas, T.J., Landes, E.L., Moore, J.P. and Kuhmann, S.E. 2007. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor bound form of CCR5 for entry. *Virology*. 361:212–28.
121. Rana, T.M. and Jeang, K.T. 1999. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 365:175-85.
122. Reeves, J., Simmons, G., Dejucq, N., Hibbitts, S., McKnight, A., Azevedo Pereira, J.M., Moniz-Pereira J. and Clapham P. 2000. Comparison of CD4-independent infection by HIV-1, HIV-2 and SIV strains, and relevance of receptors other than CCR5 and CXCR4 for infection of primary cell types. *International Conference of AIDS 2000*.
123. Reeves, J. D. and Doms R.W. 2002. Human immunodeficiency virus type 2. *Journal General Virology*. 83: 1233-1265.

124. Reeves, J. D., Hibbitts, S., Simmons, G., McKnight, A., Azevedo-Pereira, J.M., Moniz -Pereira J. and Clapham P.R. 1999. Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4- negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *Journal of Virology*. 73:7795-7804.
125. Reeves, J.D., Gallo, S.A., Ahmad, N., Miamidian, J.L., Harvey, P.E., Sharron,M., Pohlmann, S., Sfakianos, J.N., Derdeyn, C.A., Blumenthal, R., Hunter, E. and Doms, R.W., 2002. Sensitivity of HIV-1 to entry inhibitors correlates with envelope/coreceptor affinity, receptor density, and fusion kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99: 16249–1625.
126. Ribeiro, R. M., Hazenberg, M. D., Perelson, A. S. and Davenport M. P. 2006. Naive and memory cell turnover as drivers of CCR5-to-CXCR4 tropism switch in human immunodeficiency virus type 1: implications for therapy. *Journal of Virology*. 80:802-809.
127. Rizzuto, C.D., Wyatt, R., Hernandez-Ramos, N., Sun, Y., Kwong, P.D., Hendrickson, W.A and Sodroski, J. 1998. A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science*. 280:1949-53.
128. Roeth, J. F. and. Collins, K. L. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. 70:548-563.

129. Samson, M., Libert, F., Doranz, B. J., Rucker, J., Liesnard, C., Farber, C. M., Saragosti S., Lapoumeroulie, C., Cognaux, J., Forceille, C., Muyldermans, G., Verhofstede, C., Burtonboy, G., Georges ,M., Imai, T., Rana, S., Yi, Y., Smyth, R. J., Collman, R. G., Doms, R. W., Vassart, G. and Parmentier, M. 1996. Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 382:722–725.
130. Santiago, M. L., Range, F., Keele, B. F., Li, Y., Bailes, E., Bibollet-Ruche, F., Fruteau, C., Noe ,R., Peeters, M., Brookfield, J. F., Shaw, G. M., Sharp, P. M. and Hahn H. B. 2005. Simian immunodeficiency virus infection in free-ranging sooty mangabeys (*Cercocebus atys atys*) from the Tai Forest, Cote d'Ivoire: implications for the origin of epidemic human immunodeficiency virus type 2. *Journal of Virology*. 79:12515-12527.
131. Santos, N.C., Prieto, M. and Castanho, M.A.R.B.1998. Interaction of the major epitope region of HIV protein gp41 with membrane model systems. A fluorescence spectroscopy study. *Biochemistry*. 37: 8674-8682.
132. Santos-Costa, Q., Abreu, F. and Azevedo-Pereira J. 2007. Human Immunodeficiency Virus Type 2 - The Masquerade who hides the face so the world could never find him. In VIII Congresso Virtual HIV/AIDS. [http://www.aidscongress.net/article.php?id\\_comunicacao=336](http://www.aidscongress.net/article.php?id_comunicacao=336).
133. Seibert, C, Ying, W., Gavrillov, S., Tsamis, F., Kuhmann, S.E., Palani, A., Tagat, J.R., Clader, J.W., McCombie, S.W., Baroudy, B.M., Smith, S.O., Dragic

- T., Moore, J.P and Sakmar, T. P. 2006. Interaction of small molecule inhibitors of HIV-1 entry with CCR5. *Virology* 349:41-54.
134. Shankarappa, R., Margolick, J. B., Gange, S. J., Rodrigo, A. G., Upchurch, D., Farzadegan, H., Gupta, P., Rinaldo, C. R., Learn, G. H., He, X., Huang, X. L. and. Mullins, I. J. 1999. Consistent viral evolutionary changes associated with the progression of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Journal of Virology*. 73:10489-10502.
135. Shi, Y., Brandin, E., Vincic, E., Jansson, M., Blaxhult, A., Gyllensten, K., Moberg, L, Brostrom, C., Fenyo, E.M. and Albert, J. 2005. Evolution of human immunodeficiency virus type 2 coreceptor usage, autologous neutralization, envelope sequence and glycosylation. *Journal of General Virology*. 86:3385-3396.
136. Shimizu, N, Tanaka, A., Oue, A., Mori, T., Ohtsuki, T., Apichartpiyakul, C., Uchiumi, H., Nojima, Y. and Hoshino H. 2009. Broad usage spectrum of G protein-coupled receptors as coreceptors by primary isolates of HIV. *AIDS*. 27:761-769.
137. Simmons, G., Reeves, J. D., Hibbitts, S., Stine, J. T., Gray, P. W., Proudfoot, A. E. and Clapham P. R. 2000. Co-receptor use by HIV and inhibition of HIV infection by chemokine receptor ligands. *Immunological Reviews*. 177:112-126.
138. Simmons, G., Reeves, J. D., McKnight, A., Dejucq, N., Hibbitts, S., Power, C. A., Aarons, E., Schols, D., De Clercq, E., Proudfoot, A. E. and Clapham, P. R.



1998. CXCR4 as functional coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 infection of primary macrophages. *Journal of Virology*. 72:8453-8457.
139. Simon, F., Matheron, S., Tamalet, C., Loussertajaka, I., Bartczak, S., Pepin, J. M., Dhiver, C., Gamba, E., Elbim, C., Gastaut, J. A., Saimot, A. G. and Brunvezinet, F. 1993. Cellular and Plasma Viral Load in Patients Infected with Hiv-2. *AIDS*. 7:1411-1417.
140. Smallman-Raynor, M. and Cliff A. 1991. The spread of human immunodeficiency virus type 2 into Europe: a geographical analysis. *International Journal of Epidemiology*. 20:480-489.
141. Soares, R., Foxall, R., Albuquerque, A., Cortesão, C., Garcia, M., Victorino, R. M. M. and Sousa, A. E. 2006. Increased frequency of circulating CCR5(+) CD4(+) T cells in human immunodeficiency virus type 2 infection. *Journal of Virology*. 80:12425-12429.
142. Sourial, S., Nilsson, C., Warnmark, A., Achour, A. and Harris R. A. 2006. Deletion of the V1/V2 region does not increase the accessibility of the V3 region of recombinant gp125. *Current HIV Research*. 4:229-237.
143. Spira, S. S., Wainberg, M.A., Loemba, H., Turner, D. and Brenner B.G. 2003. Impact of clade diversity on HIV-1 virulence, antiretroviral drug sensitivity and drug resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51:229-240.

144. Stebbing, J., Gazzard, B. and Douek D. C. 2004. Where does HIV live? New England Journal of Medicine. 350:1872-1880.
  
145. Stine, J. G. 2000. AIDS Update 2000: An Annual Overview of Acquired Immune deficiency Syndrome. Englewood Cliffs, N.J: Prentice Hall. p.486.
  
146. Thomas, E. R., Shotton, C., Weiss, R. A., Clapham, P. R. and Mcknight, A. 2003. CD4-dependent and CD4-independent HIV-2: consequences for neutralization. AIDS. 17:291-300.
  
147. Travers, S. A., O'connell, M. J., McCormack, G. P. and Mcinerney, J. O. 2005. Evidence for heterogeneous selective pressures in the evolution of the env gene in different human immunodeficiency virus type 1 subtypes. Journal of Virology. 79:1836-1841.
  
148. Tsamis, F., Gavrilov, S., Kajumo, F., Seibert, C., Kuhmann, S., Ketas, T., Trkola, A., Palani, A., Clader, J.W., Tagat, J.R., McCombie, S., Baroudy, B., Moore, J.P., Sakmar, T.P. and Dragic, T. 2003. Analysis of the mechanism by which the small-molecule CCR5 antagonists SCH-351125 and SCH-350581 inhibit human immunodeficiency virus type 1 entry. Journal of Virology. 77:5201-8.
  
149. Watson, C., Jenkinson, S., Kazmierski, W. and Kenakin T. 2005. The CCR5 receptor-based mechanism of action of 873140, a potent allosteric noncompetitive HIV entry inhibitor. Molecular Pharmacology 67:1268-1282.

150. Weiss, C.D. 2003. HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition. *AIDS Reviews* 5:214-21.
151. Weiss, R. A. 1996. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science*. 272:1885-1886.
152. Westby, M., Smith-Burchnell, C., Mori, J., Lewis, M., Mosley, M., Stockdale, M., Dorr, P., Ciaramella, G., and Perros M. 2007. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *Journal of Virology*. 81:2359-2371.
153. Westby, M., Marilyn, L., Whitcomb, J., Youle, M., Pozniak, A.L., James, I.T., Jenkins, T.M., Perros, M. and van der Ryst, E. 2006. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pre-treatment CXCR4- using virus reservoir. *Journal of Virology*. 80:4909-20.
154. Whittle, H., Morris, J., Todd, J., Corrah, T., Sabally, S., Bangali, J., Ngom, P.T., Rolfe, M. and Wilkins, A. 1994. HIV-2- infected patients survive longer than HIV-1- infected patients. *AIDS*. 8:1617-1620.
155. Wu, L., La Rosa, G., Kassam, N., Gordon, C.J., Heath, H., Ruffing, N., Chen, H., Humblías, J., Samson, M., Parmentier, M., Moore, J.P. and Mackay C.R. 1997. Interaction of chemokine receptor CCR5 with its ligands: multiple

- domains for HIV-1 gp120 binding and a single domain for chemokine binding. *Journal of Experimental Medicine*. 186:1373–8.
156. Wyatt, R. and Sodroski, J. 1998. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 280:1884-8.
157. Xiao, L., Owen, S.M., Goldman, I., Lal, A.A., de Jong, J.J., Goudsmit, J. and Lal, R.B. 1998. CCR5 coreceptor usage of non-siyncytium-inducing primary HIV-1 is independent of phylogenetically distinct global HIV-1 isolates: delineation of consensus motif in the V3 domain that predicts CCR-5 usage. *Virology*. 240:83-92.
158. Yamaguchi, J., Devare S. G. and Brennan, C. A. 2000. Identification of a new HIV-2 subtype based on phylogenetic analysis of full-length genomic sequence 1. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 16:925-930.
159. Zingman, B., Suleiman, J., De Jesus, E., Slim, J., Mak ,C ., McCarthy, M., Case N. and Dunkle L. 2008. Vicriviroc in Combination Therapy with an Optimized ART Regimen for Treatment-experienced Subjects: VICTOR-E1. 15th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, EUA, 3-6 Fevereiro 2008, Poster 795.